

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών μεταξύ του Τμήματος Φυτικής  
Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος και του Τμήματος Γεωπονίας Ζωικής  
Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

ΑΝΘΙΜΟΣ Χ. ΚΑΜΠΟΥΡΙΔΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ *PINUS HALEPENSIS*



ΒΟΛΟΣ 2009

Χαρακτηρισμός μοριακών δεικτών του *Pinus halepensis*.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**A. ΜΑΥΡΟΜΑΘΗΣ**

(Μέλος)

Επίκουρος καθηγητής Π.Θ.  
(Γενετική βελτίωση φυτών)

**I. ΓΟΥΝΑΡΗΣ**

(Επιβλέπων)

Καθηγητής Π.Θ.  
(Μοριακή βιολογία)

**E. ΒΑΡΔΑΒΑΚΗΣ**

(Μέλος)

Λέκτορας Π.Θ.  
(Συστηματική βοτανική)

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα την μεταπτυχιακή μου διατριβή Καθηγητή κ. Ιωάννη Γούναρη για τη συνεχή καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας μου, καθώς και για την τελική διαμόρφωση της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Τον Επίκουρο καθηγητή κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη για τις επισημάνσεις και υποδείξεις κατά τη διάρκεια της συγγραφής της μεταπτυχιακής μου διατριβής και τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης τον Λέκτορα κ. Εμμανουήλ Βαρδαβάκη για τη βοήθεια, τις προτροπές και τις επισημάνσεις του καθώς και στη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Αθανάσιο Κορκόβελο για τη συμβολή και την βοήθεια του κατά την στατιστική ανάλυση των δεδομένων της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, η οποία στάθηκε αρωγός αυτής όπως και κάθε άλλης προσπάθειας μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	4
<b>1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ</b> .....	8
3.1. Η ΧΑΛΕΠΙΟΣ ΠΕΥΚΗ ( <i>Pinus halepensis</i> ).....	14
3.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ <i>Pinus halepensis</i> .....	14
3.1.1.1. CONIFEROPHYTES (Κωνιφερόφυτα ή Κωνοφόρα).....	15
3.1.1.2. ΤΑΞΗ CONIFERALES – ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ PINACEAE.....	16
3.1.1.3. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΩΝ. ( <i>Pinus halepensis</i> ).....	17
3.1.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	18
3.1.4. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΠΕΥΚΟΔΑΣΩΝ.....	19
3.1.5. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	22
3.1.6. ΥΠΕΡΓΕΙΑ ΤΡΑΠΕΖΑ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ.....	25
3.1.7. ΕΔΑΦΙΚΗ ΤΡΑΠΕΖΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ.....	26
<b>3.2. ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥ- ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ</b> .....	29
3.2.1. Μορφολογικοί δείκτες.....	30
3.2.2. Βιοχημικοί δείκτες.....	31
3.2.3. Μοριακοί δείκτες.....	33
3.2.4. Χαρακτηριστικά των μοριακών δεικτών.....	35
3.2.5. Εφαρμογές των μοριακών δεικτών.....	35
3.2.6. Τύποι DNA των μοριακών δεικτών.....	37
3.2.6.1. Τεχνικές που δεν βασίζονται στην PCR.....	37
3.2.6.2. Τεχνικές που βασίζονται στην PCR.....	38
3.2.7. Εφαρμογές των μοριακών δεικτών RAPDs.....	41
<b>4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	43
4.1. Προετοιμασία του γενετικού υλικού.....	43
4.2. Μέθοδος απομόνωσης του DNA.....	43
4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση.....	45
4.4. Στατιστική ανάλυση.....	47
<b>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ &amp; ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	48
5.1 Αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων.....	48
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	58
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	59

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ερευνήθηκε η γενετική ποικιλομορφία 20 γενοτύπων, οι οποίοι προέρχονται από φυσικούς πληθυσμούς *Pinus halepensis* από τις περιοχές της Χαλκιδικής (10 γενότυποι) και της Εύβοιας (10 γενοτυποι). Η μελέτη εφαρμόστηκε σε μίγμα γενοτύπων από κάθε πληθυσμό με κριτήριο την παραγωγή ρητίνης. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 5 δείγματα που παρήγαγαν υψηλή ποσότητα ρητίνης (High resin) και 5 που παρήγαγαν χαμηλή ποσότητα ρητίνης (Low resin) και έγινε προσπάθεια συσχέτισης.

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση του γενετικού χαρακτηρισμού και ο εντοπισμός του φαινότυπου φυτών του είδους *Pinus halepensis* ως προς την παραγωγή σε ρητίνη με τη βοήθεια μοριακών δεικτών τύπου RAPDs.

Για την αξιολόγηση των γενοτύπων με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD ελήφθησαν δείγματα σπόρων από φυσικούς πληθυσμούς *Pinus halepensis* από τις περιοχές της Χαλκιδικής και της Εύβοιας. Το DNA απομονώθηκε από το απλοειδές ενδοσπέρμιο σπόρων του είδους *Pinus halepensis*, στους οποίους απομακρύνθηκε με νυστέρι το έμβρυο, σύμφωνα με την μέθοδο CTAB. Για κάθε γενότυπο χρησιμοποιήθηκαν 5 σπόροι για την εξαγωγή του DNA. Όλα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο σε απορρόφηση  $A_{260nm}$  με σκοπό την συγκέντρωσης DNA και στα  $A_{280nm}$  ώστε να βρεθεί η παρουσία πρωτεϊνών στο δείγμα  $A_{260nm}/A_{280nm}$ .

Για την μοριακή ανάλυση των γενοτύπων χρησιμοποιήθηκαν 48 μονόκλωνοι εκκινητές τύπου RAPDs των σειρών OPG, OPF, OPD. Τα δεδομένα κωδικοποιήθηκαν και ακολούθησε η ηλεκτρονική επεξεργασία τους σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα. Η παρουσία των ζωνών αντιπροσωπεύτηκε από τη μονάδα και η απουσία από το μηδέν. Με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης με τη μέθοδο UPGMA και NEIGHBORJOIN με βάση τους δείκτες Jaccard και DICE.

Από τους 48 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, οι 13 δεν έδωσαν μπάντες (27%). Οι υπόλοιποι εκκινητές έδωσαν 160 πολυμορφικές ζώνες στο σύνολο και κατά μέσο όρο 4,6 ανά εκκινητή. Οι πολυμορφισμοί συνολικά έφτασαν τους 75 και κατά μέσο όρο κυμαίνονταν στους 2 ανά εκκινητή. Ο εκκινητής OPG-12 (5'-CAGCTCACGA-3') παρουσίασε το μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφικών ζωνών (13) και τους περισσότερους πολυμορφισμούς 7.

Η ανάλυση των δεδομένων δεν έδωσε σαφή διαχωρισμό των δυο γενοτύπων (Χαλκιδικής και Εύβοιας) τόσο εντός του πληθυσμού σε γενότυπους υψηλής και χαμηλής ρητίνης όσο και μεταξύ των δυο πληθυσμών των δυο περιοχών. Από τα δενδρογράμματα φαίνεται ότι αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα στους πληθυσμούς της Εύβοιας.

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Pinus* περιλαμβάνει 95 περίπου είδη, που φύονται στο βόρειο ημισφαίριο. Στην χώρα μας φύονται τα είδη *Pinus halepensis*, *Pinus brutia*, *Pinus nigra*, *Pinus leucodermis*, *Pinus peuce* που ανήκει γενετικά ανήκει στην ομάδα *halepensis* (**Panetsos, 1981**).

Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis*) είναι ένα είδος πεύκου που ανήκει αποκλειστικά στα είδη που απαντώνται στην Λεκάνη της Μεσογείου. Προτιμά περιοχές με υψηλή μέση ετήσια θερμοκρασία και είναι προσαρμοσμένο σε μακρά διάρκειας καλοκαιρινές συνθήκες ξηρασίας (**Quezel, 1986**).

Αποτελεί ένα πολύτιμο δασοπονικό είδος για την χώρα μας καθώς καλύπτει μια σημαντική έκταση των ελληνικών δασών και έχει αυξημένη δυνατότητα για παροχή ποικίλης φύσεως αγαθά, όπως ξύλο, ρητίνη, μελισσοτροφή, αναψυχή και προστασία των εδαφών της έντονα οικονομικής ζώνης. Παρέχει λοιπόν απασχόληση στον πληθυσμό και εμφανίζει εκτεταμένη ποικιλότητα. Η προφανής οικονομική σημασία του είδους, δικαιολογεί την πολύπλευρη έρευνα που γίνεται για την μεγιστοποίηση της προσφοράς των δασών σε κάθε δυνατό προϊόν και υπηρεσία.

Η γενετική βελτίωση ως επιστήμη και η εφαρμογή της στην δασοπονία δίνει ιδιαίτερη έμφαση σε χαρακτήρες που εξασφαλίζουν την προσαρμογή στο περιβάλλον πέρα από την εξασφάλιση της αυξημένης παραγωγής δασικών προϊόντων. Με τον έλεγχο των απογόνων είναι δυνατό να προκύψουν απόγονοι που να ικανοποιούν ποσοτικά και ποιοτικά τις επιδιώξεις μας (**Panetsos, 1986**).

Στον ελλαδικό χώρο δάση με δέντρα *Pinus halepensis* υπάρχουν στις περιοχές της Πελοποννήσου, της Ηπείρου, της Χαλκιδικής, στην ανατολική Θεσσαλία, στα δυτικά νησιά του Αιγαίου και στα Ιόνια νησιά. Τα δάση με είδη *Pinus halepensis* καταλαμβάνουν μια έκταση 327.370 στρεμμάτων, κάτι που αντιστοιχεί στο 13,3% των ελληνικών δασών. Ειδικά για την βόρεια Ελλάδα τα δάση με *Pinus halepensis* υπάρχουν μόνο στην χερσόνησο της Χαλκιδικής. Είναι ένα αειθαλές πλατύφυλλο είδος με μέσο υψόμετρο ανάπτυξης από την ακτή στα 800 μέτρα και μέγιστο όριο ανάπτυξης στα 1050 μέτρα στο όρος Κηλήνη και στο όρος Χέλμος στην Πελοπόννησο (**Basiotis, 1972**).

Προτιμά ασβεστολιθικά, ελαφριά ή βαριά εδάφη με ασβεστόλιθο όπως επίσης και εδάφη με σερπεντίνη. Τα δάση με χαλέπιο πεύκη στην Ελλάδα αποτελούν συνέχεια εκείνων της νότιας Γαλλίας και της Λιγκυρίας στην βορειοδυτική Ιταλία, μιας και τα



δάση αυτά έχουν τα ανατολικά σύνορα στα οποία διανέμονται στην Ελλάδα (**Pavlidis 1976**).

Οι γενετιστές που ασχολούνται με τους φυσικούς πόρους έχουν σκοπό να εκτιμήσουν το μέγεθος και το εύρος της γενετικής παραλλακτικότητας σε είδη τα οποία έχουν οικονομική σημασία καθώς και σε απειλούμενα είδη (**Fritsch & Rieseberg, 1996**).

Οι μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την έρευνα της γενετικής ποικιλομορφίας του *Pinus halepensis*.

Με μοριακούς δείκτες τύπου ερευνήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα του Κινεζικού πεύκου (*Pinus tabulaeformis*). Αποτελεί ενδημικό είδος στην Κίνα και είναι από τα πιο διαδεδομένα είδη πεύκου στην βόρεια Κίνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πληθυσμοί είχαν ένα σχετικά υψηλό επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας ( $H_t=0,3268$ ) το οποίο διανέμεται κυρίως εντός (79,2%) και λιγότερο μεταξύ των πληθυσμών (20,8%). Οι πληθυσμοί των βουνών Lingkong και Waling παρουσίασαν υψηλότερο επίπεδο ποικιλομορφίας (0,2687) σε σχέση με τους άλλους τέσσερις (0,2537). Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικές σημαντικές σχέσεις μεταξύ των γενετικών αποστάσεων και των γεωγραφικών αποστάσεων βάση του τεστ Μέντελ. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο διαχωρισμός της γενετικής ποικιλομορφίας σε κάθε πληθυσμό μπορεί να έχει επηρεαστεί όχι μόνο από τις θερμοκρασιακές μεταβολές και την διαθεσιμότητα του νερού αλλά και από παράγοντες όπως η προηγούμενη περίοδος των παγετώνων και οι ανθρώπινες δραστηριότητες (**Wang & Gao, 2009**).

Η γενετική σχέση μεταξύ 4 ειδών Μεξικάνικων λευκών πεύκων (*Pinus ayacachuite*, *Pinus strobiformis*, *Pinus lambertiana*, *Pinus chiapensis*) εκτιμήθηκε με τη χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPDs. 69 εκκινητές έδωσαν 247 ζώνες από δείγματα DNA από 10 πληθυσμούς. Επιπλέον 4 ειδικά επιλεγμένοι εκκινητές έδωσαν 27 ζώνες σε 176 ατομικά δείγματα DNA. Κατασκευάστηκε δένδρογραμμα με τη μέθοδο UPGMA βάση του δείκτη ομοιότητας Jaccard. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα είδη *P. ayacachuite* και *P. strobiformis* είναι πιο κοντά γενετικά και πιο κοντά σε αυτά βρίσκεται το *P. lambertiana*. Το πιο απομακρυσμένο γενετικά είδος ήταν το *P. chiapensis*. Η ανάλυση κατά ομάδες (Cluster analysis) δεν διαχώρισε το είδος *P. strobiformis* ως διαφορετικό από το *P. ayacachuite* (**Castro-Felix et al., 2008**).

Το Κινέζικο πεύκο *Pinus tabulaeformis* είναι ένα είδος που εκτείνεται από τα βορειοανατολικά έως τα νοτιοδυτικά της Κίνας. Επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της δομής και της λειτουργίας των εκεί οικοσυστημάτων.

Ερευνήθηκε η γενετική ποικιλομορφία 5 ευρέως διαδεδομένων πληθυσμών πεύκου στο οροπέδιο Shanxi, με την χρήση 15 εκκινητών τύπου RAPDs και 5 δεικτών ISSR σε 140 ατομικά δείγματα. Βάση των αποτελεσμάτων των δυο δεικτών, η γενετική παραλλακτικότητα κατά Nei ήταν 0,2842 και 0,3078 και κατά Shannon 0,4332 και 0,4468. Η γενετική ποικιλομορφία σε επίπεδο ειδών ήταν σχετικά υψηλή σε σχέση με άλλα γένη της οικογένειας Pinaceae. Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία παρατηρήθηκε στον πληθυσμό του βουνού Lingkong(0,3860) και η μικρότερη στον πληθυσμό του βουνού Laya (0,3352), πιθανώς λόγω φυσικής προσαρμογής και ανθρώπινων παρεμβάσεων. Η σχετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών ήταν 0,1491 και 0,1356 κάτι που δείχνει ότι η μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία ήταν εντός του πληθυσμού (~0,8509) παρά μεταξύ των πληθυσμών (Li et al., 2008).

Ο Mehes et al., (2007) μελέτησαν την γενετική ποικιλομορφία δυο πεύκων του *Pinus strobus* και του *Pinus monticola* στον Καναδά, με την χρήση δεικτών ISSR και RAPDs, μεταξύ και εντός του πληθυσμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών ήταν χαμηλότερη για το *Pinus monticola* σε σχέση με το *Pinus strobus*. Και για τα δυο είδη οι τιμές γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των πληθυσμών ήταν μικρότερες σε σχέση με εντός του πληθυσμού. Οι πληθυσμοί του *Pinus monticola* ήταν πιο κοντά γενετικά μεταξύ τους από ότι ο *Pinus strobus*. 6 ISSR και 4RAPDs κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Ζευγάρια εκκινητών βάση αυτών των αλληλουχιών σχεδιάστηκαν και γενωμικοί SCAR εκκινητές για τα είδη *P. monticola* και *Pinus strobus* αναπτύχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν.

Για τον καθορισμό της πιθανής επίδρασης της υπερεκμετάλλευσης στην γενετική δομή των πληθυσμών του κόκκινου πεύκου *Pinus brutia* Ten. στην Τουρκία ερευνήθηκαν 3 φυσικοί και 3 υπερεκμεταλλευόμενοι πληθυσμοί (ανθρώπινη παρέμβαση) στην Μεσογειακή πλευρά της Τουρκίας με χρήση δεικτών RAPDs. Εξετάστηκαν 80 εκκινητές, 12 από αυτούς έδωσαν 137 πολυμορφικές ζώνες. 4 πληθυσμοί έδωσαν μοναδικά τμήματα. Ο μέσος όρος των πολυμορφικών τμημάτων για όλους τους πληθυσμούς κυμαινόταν από 89,8% έως 98,9%. Δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσικών (94,8%) και υπερεκμεταλλευόμενων (92,7%) πληθυσμών. Ο εκτιμώμενος βαθμός ετεροζυγωτίας έδειξε ότι το κόκκινο πεύκο διατηρεί υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας (0,24-0,28), μολονότι οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε φυσικούς ( $H_e=0,28$ ) και υπερεκμεταλλευόμενους ( $H_e=0,27$ ) δεν διέφεραν σημαντικά. Η μέση τιμή του  $F_{st}$

έδειξε ότι το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλομορφίας ήταν εντός των πληθυσμών (93%). Η τιμή αυτή ήταν χαμηλότερη για τους φυσικούς (92%). Στους υπερεκμεταλλευόμενους πληθυσμούς παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ομοζυγωτία κατά 6% από αυτή των φυσικών πληθυσμών κάτι που δείχνει ενδογαμία στο είδος *Pinus brutia* (Lise et al., 2007).

15 πληθυσμοί *Pinus mugo* υποείδος *mugo* (θάμνος) και *Pinus mugo* υποείδος *uncinata* που βρίσκονται στις Άλπεις ερευνήθηκαν για την εύρεση γενετικής ποικιλομορφίας με τη χρήση δεικτών τύπου RAPDs. Επίσης τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των θηλυκών πεύκων αναλύθηκαν. Σύμφωνα με την AMOVA η μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία ήταν εντός του πληθυσμού (83,39%) και μόνο το 1,25% μεταξύ των υποειδών. Οι πληθυσμοί διέφεραν γενετικά μεταξύ τους βάση του δείκτη  $N_{ei}$  από 0,227 έως 0,397. Τα μορφολογικά δεδομένα έδειξαν διαφορές μεταξύ των ειδών αν και κανείς πληθυσμός δεν εμφάνισε πλήρη συμφωνία. Σημαντική συσχέτιση υπήρχε μεταξύ των μητρών των γεωγραφικών και των μορφολογικών αποστάσεων. Δεν υπήρξε συσχέτιση των γενετικών αποστάσεων (Monteleone et al., 2006).

Δυο είδη πεύκου *Pinus sylvestris* L. σε χαμηλά υψόμετρα και στην υποαλπική ζώνη, διαχωρίζονται μορφολογικά στην κεντρική-αλπική Valais (Αυστρία), μια ξηρή ηπειρωτική κοιλάδα. Τα πεύκα που βρίσκονται σε χαμηλά υψόμετρα δείχνουν μια εξασθένηση από τις αρχές του 1990. Επιλέχθηκαν 4 ζευγάρια υψομετρικών πληθυσμών στην περιοχή και 2 επιπλέον ζευγάρια σε άλλες 2 κέντρο-αλπικές περιοχές. Οι γενετικές διαφορές των δυο τύπων πεύκου(υψόμετρο και ζωτικότητα) μελετήθηκαν με την χρήση δεικτών RAPDs. Η ανάπτυξη σε διάμετρο και σε μέγεθος του ξύλου ερευνήθηκε επίσης. Τα ζευγάρια των πληθυσμών έδειξαν αδύναμη αλλά σημαντική γενετική διαφορά ( $\Phi_{st}=4,2\% - 5,8\%$ ) με μια εξαίρεση. Δεν υπήρξε γενετική συσχέτιση μεταξύ γενετικών δεδομένων και εξασθένησης. Πιθανές εξηγήσεις που μπορούν να δοθούν είναι η μετανάστευση κατά την περίοδο των παγετώνων, φαινολογικός διαχωρισμός, άνεμοι διαφορετικής κατεύθυνσης, διαφορετική εξέλιξη. Διαφορές στην ανάπτυξη και το μέγεθος του ξύλου ενίσχυσαν την υπόθεση της προσαρμογής στις τοπικές υδρολογικές συνθήκες (Fournier et al., 2006).

Η γενετική ποικιλομορφία του *Pinus genardiana* στην περιοχή Himachal Pradesh (Ινδία) ερευνήθηκε με την χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPDs. 24 γενότυποι που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές περιοχές στα όρια διασποράς του πληθυσμού

επιλέχθηκαν τυχαία για την ανάλυση. 30 εκκινητές έδωσαν 413 μπάντες από τις οποίες οι 390 (94%) ήταν πολυμορφικές. 11 από τους 24 γενότυπους διαχωρίστηκαν βάση των μοναδικών τους τμημάτων. Κατασκευάστηκε δένδρογραμμα με την μέθοδο UPGMA το οποίο έδειξε ότι οι γενότυποι δεν διαχωρίστηκαν ανάλογα με την τοποθεσία επιλογής τους. Αυτό αποδίδεται στην υψηλή σταυρογονιμοποίηση των ειδών και του μικρού εύρους διανομής τους στην περιοχή (**Kant et al., 2006**).

Η γενετική ποικιλομορφία του *Pinus halepensis* αναλύθηκε σε 9 πληθυσμούς (6 από την Ισπανία, και 1 από Ελλάδα, Τυνησία, Γαλλία). 24 εκκινητές RAPDs χρησιμοποιήθηκαν για 60 δείγματα από μεγαγαμετοφυτικό DNA. Υπολογίστηκε ο δείκτης  $N_e$  και το ποσοστό των αλληλομόρφων. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα εντός του πληθυσμού. Επίσης η  $G_{st}$  = 13,6% ήταν υψηλότερη σε σχέση με άλλες μελέτες. Οι δείκτες RAPDs αποδείχθηκαν σημαντικοί για την μελέτη της ποικιλομορφίας μεταξύ των πληθυσμών. Επίσης έδειξαν ότι οι πληθυσμοί της ανατολικής Μεσογείου ακολούθησαν διαφορετική εξέλιξη από αυτούς της δυτικής Μεσογείου (**Gomez et al., 2001**).

Μελετήθηκε και συγκρίθηκε η γενετική παραλλακτικότητα Κορεάτικων πεύκων (*Pinus koraiensis* Sieb et Zucc) από 12 φυσικούς πληθυσμούς της Κορέας, της Κίνας, της Ρωσίας(ανατολικά) με την χρήση αλλοενζύμων και δεικτών τύπου RAPDs. 18 αλλοένζυμα και 38 εκκινητές αναλύθηκαν. Το επίπεδο της παραλλακτικότητας των αλλοενζύμων ( $A=1,95$ ,  $P_{95}=46,8\%$ ,  $H_o=0,158$ ,  $H_e=0,169$ ) και ο βαθμός της γενετικής παραλλακτικότητας ( $F_{st}=0,069$ ) συγκρίθηκαν με άλλα αποτελέσματα πεύκων με παρόμοια οικολογικά και ιστορικά χαρακτηριστικά. Τα αλλοένζυμα ( $H_e$ ) και η παραλλακτικότητα των RAPDs(δείκτης Shannon) μειώνονται από τα νότια (Κορέα) προς τα βόρεια (Ρωσία), κάτι που ενισχύει την υπόθεση της μετανάστευσης προς τα βόρεια. Οι διαφορές μεταξύ των 3 περιοχών (Κορέα, Κίνα, Ρωσία), όπως και μεταξύ των πληθυσμών των περιοχών ήταν μικρές. Η πραγματική ροή των γονιδίων ( $N_m=3,4$ ) είναι μια μερική εξήγηση αυτού του αποτελέσματος. Αλγόριθμοι ομαδοποίησης με την χρησιμοποίηση διαφόρων μετρήσεων των γενετικών αποστάσεων αποκάλυψαν σημαντικά γεωγραφικά πρότυπα σε επίπεδο αλλοενζύμων και RAPD. Οι κλειστοί γεωγραφικά πληθυσμοί ομαδοποιούνται μεταξύ τους. Από την άλλη δυο Κινεζικοί πληθυσμοί (Xobukho και Wangging) ομαδοποιήθηκαν με τον Ρωσικό πληθυσμό. Το βουνό Xiaoxing'anling και άλλα που εκτείνονται από τα νότια προς τα βόρεια λειτουργούν σαν εμπόδια για την ροή των γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών πεύκων στα βουνά Xobukho και Wangging(βρίσκονται ανατολικά των

βουνών) και του πληθυσμού στα δυτικά των βουνών. Η γενετική ποικιλομορφία και παραλλακτικότητα που εκτιμήθηκε βάση των δεικτών RAPDs συμφωνούσε με αυτά των αλλοενζύμων (**Kim et al., 2005**).

Μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs χρησιμοποιήθηκαν για να μετρηθεί η γενετική ποικιλομορφία εντός και μεταξύ των πληθυσμών του πεύκου *Pinus massoniana* (Κίνα). Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή γενετική παραλλακτικότητα εντός πληθυσμών και χαμηλή μεταξύ πληθυσμών. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες με αλλοένζυμα. Το δενδρόγραμμα με τη μέθοδο UPGMA έδειξε μια γενετική ομοιομορφία σε όλη την νότια Κίνα. Αυτό είναι αποτέλεσμα μιας μεγάλης κλίμακας τεχνητής αναδάσωσης που είχε γίνει παλαιότερα. Η σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της γενετικής παραλλακτικότητας και του υψομέτρου υποδεικνύει ότι οι πληθυσμοί σε χαμηλότερα υψόμετρα έχουν μικρότερη γενετική ποικιλομορφία σε σχέση με υψηλότερα υψόμετρα (**Peng et al., 2003**).

Μοριακοί δείκτες RAPDs και AFLPs χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ και εντός 21 πληθυσμών *Pinus brutia* που επιλέχθηκαν από 5 διαφορετικές περιοχές της Συρίας. Μετά την σάρωση με 400 εκκινητές OPERON, μόνο 9 βρέθηκαν ικανοί να εντοπίσουν πολυμορφισμούς μεταξύ των δειγμάτων. Οι AFLPs επιβεβαίωσαν την χαμηλή γενετική παραλλακτικότητα. Ακόμη και μετά την πέψη των μονομορφικών τμημάτων RAPD με περιοριστικά ένζυμα δεν αποκαλύφθηκε πολυμορφικότητα μεταξύ των δειγμάτων. Ο συνολικός αριθμός των πολυμορφικών ζωνών μεταξύ των 311 δέντρων ήταν 111(74 RAPDs και 37 AFLPs). Το μεγαλύτερο επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας εντοπίστηκε στην περιοχή Latakia και το χαμηλότερο στην περιοχή Idleb. Η γενετική ποικιλομορφία εντός του πληθυσμού ήταν υψηλότερη σε σχέση με αυτή μεταξύ των πληθυσμών. Κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα βάση των αποτελεσμάτων των RAPDs και AFLPs που δείχνουν την γενετική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η γενετική παραλλακτικότητα είναι χαμηλή. Η σχετική ομοιομορφία της επιφάνειας στην βόρειο-δυτική Συρία πιθανώς να συμβάλει στην χαμηλή γενετική παραλλακτικότητα (**Choumane et al., 2004**).

### 3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

#### 3.1. Η ΧΑΛΕΠΙΟΣ ΠΕΥΚΗ (*Pinus halepensis*).

##### 3.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ *Pinus halepensis*.

Βασίλειο	Plantae – Φυτά
Υποβασίλειο	Tracheobionta – Αγγειόσπερμα φυτά
Άθροισμα	Spermatophyta – φυτά πολ/μενα με σπόρους
Διαίρεση	Coniferophyta – Conifers
Κλάση	Pinopsida
Τάξη	Pinales
Οικογένεια	Pinaceae – Pine family
Γένος	<i>Pinus</i> L. – pine
Είδος	<i>Pinus halepensis</i> Mill. – aleppo pine

(<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PIHA7>).

Τα Σπερματοφύτα αντιπροσωπεύονται από δυο μεγάλες ομάδες, τα Γυμνόσπερμα και τα Αγγειόσπερμα. Στα Γυμνόσπερμα ανήκουν φυτικά είδη που οι σπερματικές τους βλάστες δεν περιβάλλονται από άλλα προστατευτικά περιβλήματα, είναι γυμνές, ενώ στα Αγγειόσπερμα περιβάλλονται από τα καρπόφυλλα που διαμορφώνουν την ωοθήκη. Μετά την γονιμοποίηση τα σπέρματα των Γυμνόσπερμων είναι εκτεθειμένα στο περιβάλλον, ενώ των Αγγειόσπερμων ευρίσκονται εντός του καρπού, που προκύπτει από τον μετασχηματισμό της ωοθήκης ή και άλλων τμημάτων του άνθους. Στα Γυμνόσπερμα ανήκουν φυτικά είδη του γένους *Pinus* που τα σπέρματά τους αναπτύσσονται σε ειδικούς σχηματισμούς τους κώνους.

Από φυλογενετικής άποψης τα Γυμνόσπερμα προέρχονται από τα Προγυμνόσπερμα που έχουν εκλείψει και είναι γνωστά μόνο από τις απολιθωμένες μορφές της Δεβόνιου και Λιθανθρακοφόρου περιόδου. Τα πρώτα γυμνόσπερμα εμφανίστηκαν κατά την Πέρμιο περίοδο και αντικατέστησαν τα φυτά της Λιθανθρακοφόρου, που είχαν επικρατήσει για περισσότερο από 70 εκατομμύρια χρόνια. Εξελίχθηκαν όμως και εξαπλώθηκαν περισσότερο κατά το Μεσοζωικό αιώνα όπου προσαρμόστηκαν αποτελεσματικά στις συνθήκες ξηρασίας αυτής της περιόδου.

Έτσι και σήμερα τα κωνοφόρα παρουσιάζουν πολλούς ξηροφυτικούς χαρακτήρες, όπως το βαθύ ριζικό σύστημα, τον παχύ φλοιό, τα σκληρά βελονοειδή φύλλα με

παχειά εφυμενίδα και βυθισμένα στόματα και ανάλογους φυσιολογικούς μηχανισμούς.

### **3.1.1.1. CONIFEROPHYTA (Κωνιφερόφυτα ή Κωνοφόρα).**

Τα κωνοφόρα είναι δενδρώδη ή σπανίως θαμνώδη είδη, αειθαλή (Pinus) ή φυλλοβόλα (Larix). Ο κορμός τους διακρίνεται από την ασθενή εντεριώνη και το ισχυρώς ανεπτυγμένο ξυλώδες σώμα, με ετήσιους δακτυλίους και τραχεΐδες με αλωφόρα βοθρία σε μια ή περισσότερες σειρές.

Ο κορμός τους είναι συνήθως μονοποδιακός με πλευρικούς κλάδους που παρουσιάζουν συχνά σπονδυλωτή διάταξη. Οι κλάδοι τους εμφανίζουν συνήθως διαφοροποίηση σε μακροκλάδια και βραχυκλάδια.

Ο φλοιός είναι λεπτός με έντονο σχηματισμό, λεπιοειδούς ξηροφλοιού ή ρυτιδώματος. Οι ρητινοφόροι αγωγοί υπάρχουν στο φλοιό, στα φύλλα και πολλές φορές στο ξύλο. Τα φύλλα είναι σκληρά, βελονοειδή, με ένα μεσαίο νεύρο ή λεπιοειδή με σπειροειδή, σπονδυλωτή ή σταυροειδή αντίθετη διάταξη.

Τα άνθη είναι μονογενή και τα φυτάμόνους. Τα αναπαραγωγικά όργανα διαμορφώνονται σε ειδικούς σχηματισμούς τους κώνους. Τα άρρενα άνθη σχηματίζουν κατά την άνοιξη αραιές κωνοειδείς ταξιανθίες τους μικροκώνους στους οποίους οι στήμονες είναι σπειροειδώς διαταγμένοι με τους γυρεοκόκκους στην κάτω επιφάνεια τους. Τα θηλυκά άνθη σχηματίζουν κατά την άνοιξη κωνοειδείς ταξιανθίες ή ραγοειδείς τους μακροκώνους, οι οποίοι αντίθετα από τους μικροκώνους ευρίσκονται μεμονωμένοι στις κορυφές των υψηλότερων κλάδων των δέντρων.

Τα θηλυκά άνθη αποτελούνται από το καρπικό λέπιο που φέρει συνήθως δυο ορθοτρόπες ή ανάτροπες γυμνές σπερματικές βλάστες. Κάτω από τα καρπικά λέπια, που συνήθως αποξυλώνονται κατά την ωρίμανση, βρίσκονται τα καλυπτήρια λέπια.

Κάθε σπερματική βλάστη περιέχει ένα μόνο μεγασπόριο, το κύτταρο του εμβρυοσάκου. Από αυτό προκύπτει το θηλυκό γαμετόφυτο με μορφή ενός πολυκύτταρου προθαλλίου, που αναπτύσσει πολυάριθμα αρχεγόνια. Κάθε αρχεγόνιο περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό από κύτταρα λαιμού και στα Pinaceae ένα αυτοτελές κοιλιακό κύτταρο.

Τα άρρενα γαμετόφυτα περιέχονται στους γυρεοκόκκους που αιωρούμενοι στον αέρα με τους αεροφόρους αγωγούς σάκους τους (Pinus) πλησιάζουν εύκολα στις σπερματικές βλάστες. Εκεί παγιδεύονται και σε μια σταγόνα κολλωειδούς ουσίας που

προεξέχει της μικροπύλης, της σταγόνας επικονιάσεως και προσκολλώνται τελικά στην κορυφή του μεγασποριαγγείου, όπου εκβλαστάνουν με ένα γυρεοσωλήνα. Σπερματοζώδια δεν σχηματίζονται. Ο γυρεοσωλήνας εξυπηρετεί τη μεταφορά των αρρένων γαμετών στο ωοκύτταρο, όπου θα δημιουργηθεί ο διπλοειδής ζυγώτης. Έτσι ολοκληρώνεται η γονιμοποίηση που απέχει από την επικονίαση 15 μήνες.

Από το γονιμοποιημένο ωοκύτταρο προκύπτει αρχικά ένα προέμβρυο με τον αναρτήρα από το οποίο θα προκύψουν με διαφορετικούς τρόπους για κάθε μια οικογένεια και γένος, ένα ή περισσότερα έμβρυα.

Τα σπέρματα των περισσότερων κωνοφόρων μπορούν να παραμείνουν στη ζωή για αρκετά χρόνια. Σε μερικά είδη οι ώριμοι κώνοι ανοίγουν αμέσως και ελευθερώνουν τα σπέρματα τα οποία μπορούν να βλαστήσουν αμέσως μετά την διασπορά τους. Σε άλλα όμως είδη τα σπέρματα ελευθερώνονται μόνο με την υψηλή θερμότητα ή την πυρκαγιά. Η δυνατότητα αυτή αποτελεί σπουδαίο παράγοντα διαιωνίσεως και επεκτάσεως των ειδών αυτών επειδή με αυτόν τον τρόπο μετά τις πυρκαγιές τα σπέρματα που ελευθερώνονται είναι σε μεγάλες ποσότητες και έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν νέα άτομα.

Τα Κωνοφόρα προέρχονται από τα Cordaitales που έζησαν στο τέλος της Λιθανθρακοφόρου περιόδου και από αυτά προέκυψαν τα Voltziales. Στο Μεσοζωικό αιώνα γίνεται η κοσμοπολιτική εξάπλωση των Coniferales, όπου σήμερα σε πολλά μέρη της γης και ιδιαίτερα στο βόρειο ημισφαίριο σχηματίζουν εκτεταμένα δάση.

Τα κωνοφόρα περιλαμβάνουν τις τάξεις: Cordaitales, Voltziales, Coniferales και Taxales από τις οποίες, οι δυο πρώτες έχουν εκλείψει.

### **3.1.1.2. ΤΑΞΗ CONIFERALES – ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ PINACEAE.**

Περιλαμβάνει κυρίως δέντρα, σπανίως θάμνους, με πολυετή βελονοειδή φύλλα με σπειροειδή διάταξη ή φυόμενα ανά 2-5 στο άκρο βραχυκλαδίων που περιλαμβάνονται στη βάση από λεπτό δερματώδη κολεό.

Στο γένος Pinus τα φύλλα εκφύονται μόνο από βραχυκλάδια. Στο γένος Pinus οι κώνοι είναι συνήθως μόνοικοι. Οι άρρενες κώνοι με πολυάριθμους στήμονες σε σπειροειδή διάταξη, καθénas με δυο ανθήρες και γυρεοκόκκους με δυο αεροθαλάμους. Οι θηλυκοί κώνοι με πολυάριθμα άγονα καλυπτήρια λέπια σε σπειροειδή διάταξη και στη μασχάλη κάθε καλυπτηρίου ένα καρπικό λέπιο, με δυο ανάτροπες σπερματικές βλάστες στη βάση του που περιβάλλονται από ένα χιτώνα.



Κατά την μετατροπή της ταξιανθίας σε κώνο αυξάνονται ισχυρώς τα καρπικά λέπια και σχηματίζουν τα σκληρά καρπόφυλλα του. Τα καλυπτήρια μπορεί να μεγαλώσουν συνήθως όμως παραμένουν μικρά ή ατροφούν(Pinus). Κατά την διάρκεια της επικονιάσεως οι θηλυκές ταξιανθίες διατηρούν την όρθια στάση τους και οι κώνοι συνήθως αποκλίνουν από την όρθια στάση τους (Pinus).

Για την ωρίμανση των κώνων απαιτείται μακρύ διάστημα, το οποίο μπορεί να παραταθεί για 2-3 χρόνια (Pinus). Τα σπέρματα φέρουν συνήθως μεγάλο μεμβρανώδες πτερύγιο στη μια πλευρά που προέρχεται από λεπτή στιβάδα ιστού του καρπικού λεπίου και το έμβρυο αποτελείται από δυο ή περισσότερες κοτυληδόνες.

Τα είδη της οικογένειας Pinaceae φύονται συνήθως κατά μεγάλες συστάδες ή σχηματίζουν εκτεταμένα δάση και αποτελούν από φυτογεωγραφικής απόψεως κύριο στοιχείο διαφόρων φυτοκοινωνιών.

Παρέχουν πολύτιμη ξυλεία κατασκευών, καθώς και καύσιμη ξυλεία. Επίσης παρέχουν προϊόντα χαρτοπολτού, εδώδιμα σπέρματα και αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία και στην κοσμετική.

Από τις πληγές των κορμών τους (Pinus) εκρέει ρητίνη που χρησιμοποιείται στην οينوποιία και στην παραγωγή μετά από απόσταξη του τερεβινθελαίου(νέφτι) και του κολοφωνίου.

### **3.1.1.3. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΩΝ. (Pinus halepensis).**

Τα είδη των αγγειοσπέρμων αποτελούν για τον άνθρωπο πηγή διατροφής, τεχνικών υλών, ενέργειας και φαρμάκων. Η εξάρτηση του ανθρώπου από τα φυτά για τα απαραίτητα της υπάρξεως του, δηλαδή τροφή, ένδυση, στέγαση δημιουργήθηκε από τότε που πρωτοεμφανίστηκε στον πλανήτη. Στα φυτά αναζήτησε την τροφή του, αφού στην φυσική πυραμίδα της διατροφής αυτά αποτελούν τη βάση της παραγωγής οργανικής ουσίας.

Το ξύλο αποτελεί σήμερα ένα από τα πλέον χρήσιμα φυτικά προϊόντα στον κόσμο και έπαιξε, στο παρελθόν, ένα πολύ μεγαλύτερο ρόλο. Εκτός από τις εφαρμογές σαν υλικό δόμησης (κωνοφόρα), ξυλογλυπτικής (Pinus) κατασκευή χαρτιού, χαρτονιών, διαφανειών, τεχνητών κλωστικών, δοκούς σιδηροτροχιών, στύλους τηλεφωνικούς, κατασκευή κιβωτίων, δοκών μεταλλείων και ορυχείων.

Επίσης τα ξυλώδη φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προστατευτικούς σκοπούς (χειμάρροι), για αποκατάσταση καμένων εκτάσεων, αποκατάσταση λατομείων και

μεταλλείων, δημιουργία ανεμοφρακτών, βελτίωση τοπίου και δημιουργία υπαίθριας αναψυχής και χώρων πρασίνου.

Ακόμη τα ξυλώδη φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιομάζας για παραγωγή ενέργειας και άλλων χρήσιμων προϊόντων αξιοποιώντας παράλληλα εδάφη ακαλλιέργητα ορεινών, ημιορεινών, πεδινών και παραθαλάσσιων περιοχών οριακής όμως παραγωγικότητας.

Από μελισσοκομικής άποψης ενδιαφέρον παρουσιάζει στη χώρα μας το είδος *Pinus halepensis*. Παρότι τα άνθη του είναι φτωχά σε νέκταρ και η άφθονη γύρη του είναι μικρής βιολογικής αξίας, χάρη στα μελιτώματα που εκκρίνονται από διάφορα είδη αφίδων και το παράσιτο *Marchalina hellenica* συμβάλλει κατά 65% περίπου στο σύνολο της ετήσιας παραγωγής μελιού. Επίσης οι μέλισσες εκτός από την συλλογή νέκταρ και γύρης, συλλέγουν και μια κομμεορητίνη την πρόπολη από τους οφθαλμούς διαφόρων φυτικών ειδών (*Pinus*).

Τα κωνοφόρα και δη το είδος *Pinus halepensis* παράγει ρετσίνι που βιοσυνθέτετε στους ρητινοφόρους αγωγούς. Ανήκει στις ρητίνες που αποτελούν προϊόν δευτερογενών μεταβολιτών. Επίσης χρησιμοποιούνταν παλαιότερα για παραγωγή βαφικών-χρωστικών πριν από την αντικατάστασή τους από τεχνητές. Τα είδη *Pinus* spp. χρησιμοποιούνταν για βαφικά χρωστικά χρώματος καστανού και μελανού (Σαρλής, 1999).

### 3.1.3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.

Το γένος *Pinus* είναι το μεγαλύτερο και πιο σημαντικό γένος των κωνοφόρων. Απαρτίζεται από 95 είδη (Mirov, 1967), 95 είδη σύμφωνα με τον Panetsos (1981) με ευρύτατη εξάπλωση στο Βόρειο Ημισφαίριο.

Τα πεύκα απαντούν σχεδόν σε όλες τις κλιματικές ζώνες και τα οικοσυστήματα, ενώ υψομετρικά απαντούν από την παραλιακή ζώνη μέχρι τα δασοόρια. Ορισμένα είδη εξαπλώνονται ευρύτατα (π.χ. *Pinus sylvestris*), ενώ άλλα έχουν πολύ περιορισμένη φυσική κατανομή (όπως το *P. torreyana*). Τα είδη *Pinus brutia* Ten. (τραχεία πεύκη) και *Pinus halepensis* (χαλέπιος πεύκη) είναι τα πιο σημαντικά είδη πεύκων της Μεσογείου. Εκτός από την τεράστια σημασία του από οικολογική άποψη, την προστασία που προσφέρουν στο έδαφος και τη ρύθμιση της ροής του νερού, έχουν και μεγάλη οικονομική σημασία για την παραγωγή ξύλου και άλλων προϊόντων (π.χ. ρητίνη, μέλι).

Από βιολογικής άποψης, είναι είδη φωτόφιλα, λιτοδίαιτα, θερμοξηρόβια, ολιγαρκή και προτιμούν εδάφη αλκαλικά και ουδέτερα (**Τσιτσώνη, 1991**). Τα είδη αυτά είναι πυρόφιλα γιατί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίδρασης στις πυρκαγιές που ξεσπούν στις περιοχές της φυσικής τους εξάπλωσης. Έτσι δείχνουν μια μεγάλη ικανότητα προσαρμογής στις συνθήκες που δημιουργεί η πυρκαγιά (**Ντάφης, 1986**).

#### **3.1.4. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΠΕΥΚΟΛΑΣΩΝ.**

Τα είδη *P. halepensis* και *P. brutia* κυριαρχούν στην περιοχή της Μεσογείου (**Panetsos, 1981; Nahal, 1983; Ντάφης, 1987; Quezel & Barbero, 1992**). Η *P. Brutia* εξαπλώνεται στην Ανατολική περιοχή – Ανατ. Ελλάδα, Τουρκία, Κύπρο, Β. Συρία και Β.Λίβανο -, ενώ η *P. halepensis* στις υπόλοιπες παραμεσόγειες περιοχές, καθώς και στη ζώνη της Β. Αφρικής (Μαρόκο) που βρέχεται από τον Ατλαντικό ωκεανό (**Εικόνα 1 και 2**).

Η συνολική έκταση των δασών της χαλεπίου πεύκης στη Μεσογειακή λεκάνη υπολογίζεται σε 3.5 εκατ. εκτάρια. (**Ντάφης, 1987**).

Η χαλέπιος πεύκη είναι ένα ευμετάβλητο είδος και παρουσιάζει πολύ μεγάλη ενδοειδική ποικιλότητα (**Mirov, 1967; Panetsos, 1981; Skordilis & Thanos, 1995**).

Η ποικιλότητα μεταξύ των διαφορετικών οικοτύπων σχετίζεται κυρίως με τις κλιματικές συνθήκες, το υψόμετρο και το έδαφος, όμως ένα σημαντικό ποσοστό της έχει προσαρμοστική σπουδαιότητα και φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου (**Panetsos, 1981**).

Και τα δύο είδη συναντώνται σε μεγάλη ποικιλία εδαφών και μπορούν να θεωρηθούν αδιάφορα ως προς το υπόστρωμα. Παρόλα αυτά προτιμούν εδάφη μέσης σύστασης, μαλακά και βαθιά. Τα είδη που αυτοφύονται στην ευρωπαϊκή ήπειρο είναι τα εξής 11: *P. brutia*, *P. cembra*, *P. halepensis*, *P. heldreichii*, *P. mugo*, *P. uncinata*, *P. nigra*, *P. peuce*, *P. pinaster*, *P. pinea* και *P. sylvestris*. Από αυτά, μόνο τέσσερα είδη (*P. cembra*, *P. mugo*, *P. uncinata*, *P. pinaster*) δεν απαντώνται στη χώρα μας (**Gaussen et al., 1993**).



Εικόνα 1. Περιοχές όπου κατανέμετε το είδος *Pinus halepensis* στην Μεσόγειο ([www.euforgen.org](http://www.euforgen.org)).



Εικόνα 2. Φυσική κατανομή του είδους *Pinus halepensis* (κίτρινη περιοχή) και του *Pinus brutia* (γαλάζια περιοχή).  
(<http://www.fao.org/forestry/foris/data/silvamed/arezzo/alizoti.pdf>).

### 3.1.5. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.

Η χαλέπιος πεύκη είναι υποχρεωτικό σπερματογεννητικό δέντρο (δεν διαθέτει δηλαδή την ικανότητα αναβλάστησης) σε αντίθεση με τα είδη των σκληρόφυλλων (μακί) και αρκετά των φρυγάνων. Για το λόγο αυτό η αναπαραγωγική βιολογία του είδους *Pinus halepensis*, ο τρόπος σχηματισμού των κώνων, η διασπορά και η μακροβιότητα των σπερμάτων αποκτούν ιδιαίτερη σημασία για τη μεταπυρική αναγέννηση.

Η διάρκεια της νεανικής περιόδου, δηλαδή η στιγμή που τα νεαρά πεύκα που εγκαθίστανται μετά την πυρκαγιά περνούν στο αναπαραγωγικό στάδιο, έχει βαρύνουσα σημασία. Οι παραγόμενοι κώνοι, με την προϋπόθεση ότι περιέχουν βιώσιμα σπέρματα, θα εξασφαλίσουν σε μεγάλο βαθμό την αναγέννηση του είδους (και κατά επέκταση του δάσους) σε περίπτωση νέας πυρκαγιάς. Η νεανική περίοδος, και κατά συνέπεια η αρχική ηλικία παραγωγής σπερμάτων, σε διάφορους αντιπροσώπους του γένους *Pinus* ποικίλει από είδος σε είδος, αλλά και από πληθυσμό σε πληθυσμό μέσα στο ίδιο στο ίδιο είδος, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος, τις κλιματικές συνθήκες και την πιθανή γενετική διαφοροποίηση. Σε ορισμένα είδη, οι αναπαραγωγικές δομές εμφανίζονται πολύ νωρίς, όταν τα δέντρα είναι μόνο 5 έως 10 ετών, όπως στα είδη *P. clausa* και *P. contorta* στην ηλικία των 5 και 4-8 ετών αντίστοιχα. Στο *P. attenuata*, είδος αντιπροσωπευτικό της Νότιας Καλιφόρνιας, οι πρώτοι κώνοι αναπτύσσονται σε φυτάρια (που εμφανίσθηκαν μετά από φωτιά) ηλικίας 12 ετών (Vogl, 1973).

Η νεανική περίοδος της χαλέπειου πεύκης φαίνεται να είναι σχετικά μικρή, αν και τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι συχνά αντικρουόμενα (Daskalakou & Thanos, 1996). Σε φυτάρια οι πρώτες αναπαραγωγικές δομές έχουν παρατηρηθεί όταν τα πεύκα φτάσουν σε ηλικία τριών ετών (Panetsos, 1981). Στη φύση παρατηρείται μια μικρή καθυστέρηση, προφανώς εξαιτίας των δυσμενέστερων συνθηκών της φυσικής ανάπτυξης. Βασιζόμενοι σε παρατηρήσεις πεδίου οι Traubaud *et al.* (1985a) υποστήριζαν ότι ο σχηματισμός κώνων χαλεπίου πεύκης είναι δυνατόν να συμβεί σε δέντρα ηλικίας 7-11 ετών. Οι παρατηρήσεις των Achenar (1981) και Boudy (1950) έδωσαν ανάλογες τιμές ηλικίας 9,4 και 10-12 έτη, αντίστοιχα. Από παρατηρήσεις σε αναγεννώμενο δάσος της Πάρνηθας (Thanos *et al.*, 1996) φαίνεται ότι οι πρώτοι ώριμοι κώνοι παράγονται στο έκτο έτος, σε πολύ μικρό όμως ποσοστό των νεαρών πευκόφυτων. Γενικά πάντως είναι αποδεκτό ότι η διάρκεια της νεανικής φάσης της χαλεπίου πεύκης είναι σύντομη, γεγονός που θα

μπορούσε να ερμηνευτεί σαν το αποτέλεσμα της φυσικής, επιλεκτικής πίεσης του παράγοντα πυρκαγιά (**Daskalakou & Thanos, 1996**).

Οι κώνοι και τα σπέρματα στα περισσότερα είδη πεύκων ωριμάζουν στη διάρκεια του καλοκαιριού ή του φθινοπώρου του δεύτερου χρόνου από το σχηματισμό τους, ανοίγουν επάνω στο δέντρο και τα σπέρματα διασπείρονται γρήγορα, σε μεγάλες αποστάσεις χάρη στα πτερύγια που διαθέτουν. Η τραχεία και η χαλέπιος πεύκη, καθώς και ελάχιστα είδη του γένους *Pinus* αποτελούν εξαίρεση του κανόνα. Οι θηλυκοί κώνοι εμφανίζονται στην κορυφή των νεαρών βλαστών την άνοιξη. Η επικονίαση πραγματοποιείται την ίδια εποχή, ενώ η γονιμοποίηση των σπερμοβλαστών την επόμενη άνοιξη όταν οι κώνοι αποκτούν πράσινο χρώμα. Οι κώνοι ωριμάζουν το μεθεπόμενο καλοκαίρι (δηλαδή μετά από τρεις αυξητικές περιόδους από την εμφάνιση τους) και ο χρωματισμός τους μεταβάλλεται σε καστανός (**Panetsos, 1981**).

Πολλά Μεσογειακά φυτά έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς απέναντι στη φωτιά. Όπως προαναφέρθηκε, η μεταπυρική αναγέννηση των ειδών αυτών επιτυγχάνεται με αναβλάστηση ή με φύτευση σπερμάτων. Τα σπέρματα επιβιώνουν από τις υψηλές θερμοκρασίες της πυρκαγιάς εφ' όσον βρίσκονται προστατευμένα στο έδαφος ή σε υπέργειες τράπεζες σπερμάτων. Ο σχηματισμός υπέργειας σπερματικής τράπεζας είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της βραδυχωρίας (serotiny), της παραμονής δηλαδή κλάσματος ή του συνόλου της ετήσιας παραγωγής των ώριμων αναπαραγωγικών δομών που εσωκλείουν τα σπέρματα, κλειστών για αρκετά χρόνια πάνω στο δέντρο (**Lamont, 1991**).

Τα περισσότερα είδη πεύκου αναγεννώνται με σπέρματα. Εξαίρεση αποτελούν ελάχιστα είδη, όπως για παράδειγμα τα πεύκα της Β. Αμερικής *P. leiophylla*, *P. Rigida* και *P. virginiana*, τα οποία διαθέτουν ικανότητα αναβλάστησης. Με την προσαρμογή αυτή επιτυγχάνεται ταχύτερη εποίκιση του μεταπυρικού περιβάλλοντος, σε σύγκριση με το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την παραγωγή κώνων-σπερμάτων και την εγκατάσταση των νεαρών αρτιβλάστων στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες (**Stone & Stone, 1954**).

Σε βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετική με τη διατήρηση σπερμάτων ξυλωδών ειδών σε υπέργειες τράπεζες, οι **Lamont et al. (1991)** αναγνωρίζουν ως “serotinous” (δηλαδή είδη με καθυστερημένη διασπορά) είδη των οικογενειών Pinaceae του Βορείου καθώς και Cupressaceae, Myrtaceae και Proteaceae του Νοτίου Ημισφαιρίου, αντίστοιχα. Οι πληροφορίες σχετικά με την καθυστερημένη διασπορά

των σπερμάτων που αναφέρονται διεθνώς, τόσο για τα ευρωπαϊκά όσο και τα ασιατικά κωνοφόρα δασικά είδη είναι λίγες, αντίθετα δεδομένα υπάρχουν για τα περισσότερα δασικά είδη της Β. Αμερικής (**Volg, 1973; Barden, 1979; Borchert, 1985; Klaus, 1989; Frankis, 1991; Fraver, 1992; Lev-Yadum, 1992, Lev-Yadum, 1995**). Σε 23, από το σύνολο των 95 ειδών του γένους *Pinus* εμφανίζεται καθυστερημένη διασπορά των σπερμάτων από τους κώνους (βραδυχωρία), ενώ μόνο σε έξι είδη οι κώνοι ανοίγουν αποκλειστικά και μόνο μετά από φωτιά (**Lamont et al., 1991**).

Όσο αφορά τη Μεσόγειο, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για βραδυχωρία στη χαλέπιο (**Sefik, 1965; Klaus, 1989; Frankis, 1991; Young and Young 1992; Neyisci, 1993**), αλλά δεν τεκμηριώνουν επαρκώς το φαινόμενο της βραδυχωρίας για το παραπάνω είδος. Σύμφωνα με τους **Daskalakou & Thanos (1996)**, παρατηρήσεις πεδίου δείχνουν ότι ένα ποσοστό 40-80% της ετήσιας παραγωγής κώνων παρουσιάζουν καθυστέρηση στο άνοιγμα τους. Το φαινόμενο της βραδυχωρίας δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς για την τραχεία πεύκη, αλλά είναι γενικά αποδεκτό ότι συμβαίνει σε μικρότερη ένταση σε σχέση με την χαλέπιο (**Thanos, 2000**).

Όπως προαναφέρθηκε, η χαλέπιος πεύκη είναι είδος που δεν αναβλαστάνει, αλλά αναγεννάται υποχρεωτικά με σπέρματα. Τα σπέρματα είναι ήδη ώριμα από το τέλος της άνοιξης, αλλά οι κώνοι ανοίγουν βαθμιαία, προς το τέλος του καλοκαιριού και τις αρχές φθινοπώρου (**Eler, 1990**). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως ένα ποσοστό των κώνων παραμένει κλειστό για μήνες, ή και για χρόνια (**Sefik, 1965; Neyisci, 1993**). Σαν αποτέλεσμα του φαινομένου της βραδυχωρίας, κάθε χρόνο σημειώνεται μετάθεση της διασποράς μέρους των σπερμάτων για το μέλλον. Επομένως, ένας σημαντικός αριθμός σπερμάτων παραμένει στα δέντρα σαν μια υπέργεια τράπεζα σπερμάτων (canopy) που θα χρησιμοποιηθεί σε περίπτωση πυρκαγιάς. Έτσι, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, δηλαδή την περίοδο που συμβαίνουν οι πιο καταστροφικές πυρκαγιές, ένα σημαντικό κλάσμα των κώνων είναι εντελώς ή μερικώς κλειστό. Εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από τη φωτιά, οι κώνοι ανοίγουν απότομα και διασπείρεται μαζικά ένας μεγάλος αριθμός σπερμάτων.

Η παραπάνω θεωρία επιβεβαιώθηκε μετά από την πυρκαγιά του 1983 στη Σάμο, όταν από την μελέτη των καυλισμένων κώνων που συλλέχθηκαν από τα καμένα δέντρα ή το έδαφος, βρέθηκε ότι περιείχαν υγρή, γόνιμα σπέρματα (**Thanos et al., 1989**). Ομοίως, η αναγέννηση του *Pinus brutia* μετά από πυρκαγιά στην περιοχή του



Αιγαίου επιτεύχθηκε χάρη σε σπέρματα που υπήρχαν σε καψαλισμένους κώνους στο έδαφος (**Eron & Sarigul, 1992**).

### 3.1.6. ΥΠΕΡΓΕΙΑ ΤΡΑΠΕΖΑ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ.

Πολλά Μεσογειακά φυτά έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς απέναντι στη φωτιά. Τα σπέρματα επιβιώνουν από τις υψηλές θερμοκρασίες της πυρκαγιάς εφ' όσον βρίσκονται προστατευμένα στο έδαφος ή σε υπέργειες τράπεζες σπερμάτων. Ο σχηματισμός υπέργειας σπερματικής τράπεζας είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της βραδυχωρίας (serotiny), της παραμονής δηλαδή κλάσματος ή του συνόλου της ετήσιας παραγωγής των ώριμων αναπαραγωγικών δομών που εσωκλείουν τα σπέρματα, κλειστών για αρκετά χρόνια πάνω στο δέντρο (**Lamont, 1991**).

Τα περισσότερα είδη πεύκου αναγεννώνται με σπέρματα. Εξαίρεση αποτελούν ελάχιστα είδη, όπως για παράδειγμα τα πεύκα της Β. Αμερικής *P. leilophylla*, *P. Rigida* και *P. virginiana*, τα οποία διαθέτουν ικανότητα αναβλάστησης. Με την προσαρμογή αυτή επιτυγχάνεται ταχύτερη εποίκιση του μεταπυρικού περιβάλλοντος, σε σύγκριση με το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την παραγωγή κώνων-σπερμάτων και την εγκατάσταση των νεαρών αρτιβλάστων στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες (**Stone & Stone, 1954**).

Σε βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετική με τη διατήρηση σπερμάτων ξυλωδών ειδών σε υπέργειες τράπεζες, οι **Lamont et al. (1991)** αναγνωρίζουν ως “serotinous” (δηλαδή είδη με καθυστερημένη διασπορά) είδη των οικογενειών Pinaceae του Βορείου καθώς και Cupressaceae, Myrtaceae και Proteaceae του Νοτίου Ημισφαιρίου, αντίστοιχα. Οι πληροφορίες σχετικά με την καθυστερημένη διασπορά των σπερμάτων που αναφέρονται διεθνώς, τόσο για τα ευρωπαϊκά όσο και τα ασιατικά κωνοφόρα δασικά είδη είναι λίγες, αντίθετα δεδομένα υπάρχουν για τα περισσότερα δασικά είδη της Β. Αμερικής (**Barden, 1979; Frankis, 1991; Yadum, 1992, Lev-Yadum, 1995**).

Σε 23, από το σύνολο των 95 ειδών του γένους *Pinus* εμφανίζεται καθυστερημένη διασπορά των σπερμάτων από τους κώνους (βραδυχωρία), ενώ μόνο σε έξι είδη οι κώνοι ανοίγουν αποκλειστικά και μόνο μετά από φωτιά (**Lamont et al., 1991**). Όσο αφορά τη Μεσόγειο, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για βραδυχωρία στη χαλέπιο και στην τραχεία πεύκη (**Sefik, 1965; Klaus, 1989; Frankis, 1991; Young & Young 1992;**), αλλά δεν τεκμηριώνουν επαρκώς το φαινόμενο της βραδυχωρίας

για τα δύο παραπάνω είδη. Σύμφωνα με τους **Daskalaku & Thanos (1996)**, παρατηρήσεις πεδίου δείχνουν ότι ένα ποσοστό 40-80% της ετήσιας παραγωγής κώνων παρουσιάζουν καθυστέρηση στο άνοιγμα τους. Το φαινόμενο της βραδυχωρίας δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς, αλλά είναι γενικά αποδεκτό ότι συμβαίνει (**Thanos et al, 1996**).

### **3.1.7. ΕΔΑΦΙΚΗ ΤΡΑΠΕΖΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ.**

Ο καθοριστικός ρόλος που παίζει η εδαφική τράπεζα των σπερμάτων στη μεταπυρική ανάκαμψη των Μεσογειακών οικοσυστημάτων είναι καθολικός και καλά τεκμηριωμένος (**Arianoutsou & Thanos, 1996; Ferrandis et al., 1996; Trabaud et al., 1997**). Τα σπέρματα της εδαφικής τράπεζας χαρακτηρίζονται από πρωτογενή λήθαργο ο οποίος αίρεται, είτε από τη θερμότητα της φωτιάς (**Stone & Juhren, 1951; Musil & de Witt, 1991**), είτε από κάποιο άλλο φυσικό ή χημικό ερέθισμα του μεταπυρικού περιβάλλοντος (**Brown et al., 1994**).

Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τις εδαφικές τράπεζες των Μεσογειακών πευκοδασών δείχνουν ότι το μέγεθος της τράπεζας διαφέρει ανάλογα με την χρονική περίοδο, ιδιαίτερα μεταξύ της προ- και μεταπυρικής περιόδου (**Izhaki & Ne'eman, 2000**). Η χαλέπιος πεύκη, ηλικίας άνω των δέκα ετών, διασπείρει τα σπέρματα της κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, ανεξάρτητα από την ύπαρξη πυρκαγιάς. Ένα δέντρο απελευθερώνει κατά μέσο όρο 10.290 σπέρματα το χρόνο δημιουργώντας μια ετήσια “βροχή”, πυκνότητας 240 σπερμάτων ανά m<sup>2</sup> (**Nathan et al., 1999**). Ανάλογες τιμές παρατηρήθηκαν στην Γαλλία (**Trabaud et al., 1985a**), αλλά πολύ μικρότερες στην Ελλάδα (**Thanos et al., 1996**). Η “βροχή” σπερμάτων αναμένεται να είναι πιο έντονη μετά την φωτιά, καθώς η θερμότητα προκαλεί το άνοιγμα των κώνων. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από πειραματικά δεδομένα σε διάφορες περιοχές της Μεσογειακής λεκάνης (**Trabaud et al., 1985b; Saracino & Leone, 1993; Thanos et al., 1996; Henig-Sever, 1997; Nathan et al. 1999; Izhaki et al., 2000; Eshel et al., 2000**).

Σύμφωνα με αναφορές των **Izhaki and Ne'eman (2000)**, λιγότερο από το 1% της σπερματικής “βροχής” που ακολουθεί την πυρκαγιά της χαλεπίου πεύκης ενσωματώνεται στην εδαφική τράπεζα και μόνο το 9-12% των σπερμάτων βλαστάνει, ενώ το υπόλοιπο 87-90% χάνεται. Η διαφορά μεταξύ της πυκνότητας των σπερμάτων μετά την πυρκαγιά και την πυκνότητα των αρτιβλάστων, θα μπορούσε να

αποδοθεί στην μαζική αρπαγή των σπερμάτων και στην δυσμενή επίδραση της στάχτης κάτω από τα καμένα δέντρα (Ne'eman, 1997). Κυριότεροι άρπαγες των σπερμάτων θεωρούνται τα πουλιά (Saracino *et al.*, 1997; Nathan *et al.*, 1999; Izhaki, 2000; Nathan & Ne'eman, 2000), τα τρωκτικά (Acherar *et al.*, 1984; Nathan *et al.*, 1999) και τα μυρμήγκια (Acherar *et al.*, 1984; Schiller, 1978).

Σύμφωνα με τους Daskalakou & Thanos (2004) σχεδόν αποκλειστικά υπεύθυνη για την μεταπυρική αναγέννηση του πευκοδάσους είναι η υπέργεια τράπεζα σπερμάτων, εξαιτίας του παροδικού χαρακτήρα της εδαφικής τράπεζας και της καταστροφής όλων των σπερμάτων που πιθανόν βρεθούν πάνω ή κοντά στην επιφάνεια του εδάφους κατά τη διάρκεια της φωτιάς.

Για την χαλέπιο πεύκη έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσεται κατά μέσο όρο κατά 5-20 cm χρόνο, με εξαίρεση μόνο στα πολύ πλούσια εδάφη (Daskalakou & Thanos, 1996; Traubaud *et al.* 1985a, Traubaud, 1988). Για την τραχεία πεύκη, αν και θεωρείται ότι έχει πιο αργή ανάπτυξη (Panetsos, 1981), έχουν αναφερθεί ανάλογες τιμές. Για παράδειγμα κατά τη διάρκεια των δέκα πρώτων χρόνων μετά από πυρκαγιά στην Σάμο, η μέση ετήσια ανάπτυξη ήταν 10 cm (Thanos & Marcou, 1993). Το ίδιο έχει αναφερθεί σε έρευνα στη Θάσο (Spanos, 1992). Επομένως, τα δέντρα που ανήκουν στην κλάση 1-30 cm είναι πολύ νεαρής ηλικίας (μέχρι τριών ετών). Αυτό σημαίνει ότι 13 χρόνια μετά την πυρκαγιά η φυσική αναγέννηση συνεχίζεται. Σύμφωνα με τους Thanos *et al.* (1996) τα υψηλότερα φυτάρια επιβιώνουν καλύτερα από τα λιγότερο ανεπτυγμένα, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Επομένως η παρουσία περισσότερων υψηλών φυταρίων θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη θνησιμότητα των μικρών φυταρίων. Αυτή μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη ευπάθεια, τόσο στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (ξηρασία το καλοκαίρι, χαμηλές θερμοκρασίες τον χειμώνα), όσο και στον ανταγωνισμό. Στην Πάρνηθα (Thanos *et al.*, 1996) ένα σημαντικό ποσοστό πολύ μικρών αρτίφυτων παρέμενε ζωντανό 39 μήνες μετά την πυρκαγιά: το 3,3% αυτών ανήκε στην κλάση 5-10cm, ενώ το 16,6% ήταν μεταξύ 10-15cm. Αυτά τα μικρά αρτίφυτα είναι δυνατόν να αποτελέσουν μια τράπεζα αρτίφυτων που θα αρχίσει να αναπτύσσεται πιο ζωηρά όταν οι περιοριστικοί παράγοντες (πχ ανταγωνιστική βλάστηση ή έλλειψη θρεπτικών στοιχείων) εκλείψουν. Μια τέτοια τράπεζα αρτίφυτων *Pinus brutia* έχει επίσης αναφερθεί σε αναγεννώμενα δάση στην Σάμο (Thanos & Marcou, 1993).

Σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της φυσικής αναγέννησης της χαλεπίου πεύκης παίζει η λαδανιά, η οποία εμφανίζεται σε αφθονία μετά την πυρκαγιά. Η λαδανιά αφενός

προστατεύει τα νεαρά φυτά από την άμεση ηλιακή ακτινοβολία και αφετέρου, καθώς ο μύκητας που δημιουργεί μυκόρριζα στη λαδανιά δημιουργεί επίσης μυκόρριζα στη χαλέπιο πεύκη, αυξάνεται μέχρι και 100 φορές η ικανότητα πρόσληψης νερού από τις ρίζες και συνεπώς η δυνατότητα επιβίωσης των φυταρίων. Εφόσον λοιπόν τα δένδρα που κάρηκαν έχουν μια ηλικία μεγαλύτερη των 15 ετών, η φυσική αναγέννηση της χαλεπίου πεύκης είναι εξασφαλισμένη και δεν χρειάζεται καμία αναδάσωση. Σε ό,τι αφορά τα πλατύφυλλα είδη, είτε είναι αυτά αείφυλλα όπως ο πρίνος, η αριά κλπ. είτε είναι φυλλοβόλα όπως τα πλατάνια, οι λεύκες, οι δρύες κ.λπ., ανανεώνονται πολύ γρήγορα μετά την πυρκαγιά. Στην Πάρνηθα ήδη έχουν πρεμνοβλαστήσει δίνοντας το πρώτο ελπιδοφόρο μήνυμα. Έχουν επίσης βλαστήσει τα πρώτα φθινοπωρινά βολβογεώφυτα όπως τα κυκλάμινα, οι διώχτρες, οι κρόκοι (Ντάφης, 2007).

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες στην Ελλάδα και στη Μεσόγειο γενικότερα, η συχνότητα των δασικών πυρκαγιών παρουσιάζει μια συνεχή τάση αύξησης. Το φαινόμενο αυτό, πέρα από τις αυτονόητες περιβαλλοντικές διαστάσεις, λαμβάνει συχνά κοινωνικές και οικονομικές προεκτάσεις. Παρά τη σοβαρότητα του προβλήματος, η έρευνα μέχρι πρόσφατα εστιαζόταν στην πρόβλεψη της εκδήλωσης των πυρκαγιών και στη μελέτη της συμπεριφοράς τους. Αντίθετα, πολλά κρίσιμα ερωτήματα σχετικά με την μεταπυρική αναγέννηση παραμένουν ως ένα βαθμό αναπάντητα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη φυσική αναγέννηση, ο χρόνος εμφάνισης των αρτίβλαστων πεύκου μετά από πυρκαγιά, η διαχρονική πορεία της πυκνότητας των αρτιβλάστων τα πρώτα μεταπυρικά έτη και οι αιτίες που προκαλούν την θνησιμότητα τους, είναι ορισμένα από τα ζητήματα που πρέπει να ερευνηθούν βαθύτερα. Αυτό θα οδηγήσει σε ορθότερη διαχείριση των καμένων εκτάσεων. Μόνο ένα ορθά διαχειριζόμενο φυσικό δάσος μπορεί να καλύψει όλες τις εγχειρόμενες από αυτό ωφέλειες (Thanos *et al.*, 1996).

### 3.2. ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥ-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι αναπαραγωγής των φυτών έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή νέων ποικιλιών με επιθυμητά γνωρίσματα. Οι ρυθμοί παραγωγής όμως είναι αργοί όμως στην στοχοθέτηση των σύνθετων γνωρισμάτων όπως είναι η απόδοση, η ποιότητα του σπόρου και η ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως είναι η ξηρασία. Στην παραδοσιακή βελτίωση, ο βελτιωτής κατά την διάρκεια της επιλογής των επιθυμητών φυτών αντιμετωπίζει τα εξής προβλήματα:

α) Πρέπει να μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός φυτών ως προς ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα ταυτόχρονα με την ύπαρξη άλλων επιθυμητών γνωρισμάτων(ποιότητα, ανθεκτικότητα σε ασθένειες, ανοχή στην ξηρασία).

β) Είναι πολύ δύσκολο να μελετηθεί ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού για ένα επιθυμητό γνώρισμα, όταν το γνώρισμα επηρεάζεται από το περιβάλλον.

γ) Η επιλογή δεν μπορεί να γίνει στο στάδιο του σποροφύτου και πρέπει να περιμένει μέχρι να φτάσει το φυτό στο στάδιο του ενήλικου επειδή μέσω του φαινοτύπου γίνονται ορατά τα διάφορα χαρακτηριστικά του φυτού.

ε) Είναι δύσκολο να βρεθεί γονίδιο ανθεκτικότητας, από την στιγμή που η επιλογή ενός γονιδίου είναι δύσκολη.

Η βιοτεχνολογία δίνει νέα και ισχυρά εργαλεία στους βελτιωτές, αξιοποιώντας ταυτόχρονα τη γενετική και μοριακή βιολογία. Έφερε την επανάσταση στις παραδοσιακές μεθόδους βελτίωσης.

Οι βιοχημικές και μοριακές τεχνικές μείωσαν την διάρκεια των βελτιωτικών προγραμμάτων από χρόνια σε μήνες. Βελτίωσαν την ακρίβεια των διασταυρώσεων και έδωσαν την δυνατότητα να παραχθούν άτομα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά (Φανουράκης, 2002).

Η μοριακή βελτίωση αφορά μια ομάδα τεχνικών που έχουν ως βάση την ανάπτυξη και αξιοποίηση των μοριακών δεικτών για την πρόωμη αξιολόγηση των γενοτύπων.

Με τον όρο μοριακοί ή γενετικοί δείκτες αναφέρονται τα τμήματα του DNA που προκύπτουν μετά από την κατεργασία του φυτικού γενετικού υλικού με διάφορες μεθόδους. Τα τμήματα αυτά εμφανίζονται τελικά ως διακριτές ζώνες σε ηλεκτροφορητικό προφίλ. Οι μοριακοί δείκτες είναι φαινοτυπικά ουδέτεροι και περιβαλοντικά ανεξάρτητοι και ανιχνεύουν πολυμορφισμούς δηλαδή διαφορές στις γενετικές πληροφορίες μεταξύ ατομικών φυτών (**Σκαράκης, 2005**).

Οι μοριακοί δείκτες είναι γενετικά χαρτογραφημένοι και είναι χρήσιμοι για την μελέτη της κληρονομικότητας των γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων των πληθυσμών και ως σύγχρονα εργαλεία χρησιμοποιούνται και στο χρωμοσωμικό βάδισμα για απομόνωση γονιδίων. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι οι μοριακοί-γενετικοί δείκτες είναι άμεσα συνδεδεμένοι με λειτουργικά γονίδια τα οποία εκδηλώνονται στον φαινότυπο (**Μαυρομάτης, 2005**).

Με την ιδιότητα τους αυτή, υπόκεινται σε γενετική ανάλυση, χαρτογραφούνται και χρησιμοποιούνται για την σήμανση των γενετικών θέσεων, ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων (**Σκαράκης, 2005**).

### **3.2.1. Μορφολογικοί δείκτες.**

Οι μορφολογικοί ή φαινοτυπικοί δείκτες είναι οι πρώτοι δείκτες που ανακαλύφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν. Αναφέρονται και ως παραδοσιακοί δείκτες. Μας επιτρέπουν να προσδιορίσουμε την ύπαρξη ή όχι ενός γονιδίου που μας ενδιαφέρει και με το οποίο είναι συνδεδεμένοι, από την παρουσία ή όχι κάποιων συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτού.

Η επιλογή γίνεται με βάση τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού τα οποία είναι μετρήσιμα και ορατά στο βελτιωτή. Τέτοια είναι το σχήμα, ο χρωματισμός, του φύλλου, του καρπού και των ανθέων και η αρχιτεκτονική του φυτού, η αρρενοστεριότητα, η αντοχή σε ασθένειες, η ύπαρξη τριχών και η ποσότητα τους.

Οι μορφολογικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τους βιοχημικούς και τους μοριακούς δείκτες στην διαδικασία της επιλογής ως προς κάποιο χαρακτηριστικό στην βελτίωση των φυτών και για την κατασκευή γενετικών χαρτών (**Βακαλουνάκης & Φραγκιαδάκης, 2003**).

Για να είναι αποτελεσματική και γρήγορη ή επιλογή με μορφολογικούς δείκτες πρέπει να έχουν κάποια συγκεκριμένα γνωρίσματα:

- α) Εύκολη αναγνώριση των διαφορετικών φαινοτύπων με διαχωρισμό των ομοζύγων και των ετεροζύγων ατόμων.
- β) Έκφραση των διαφορετικών φαινοτύπων στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του φυτού.
- γ) Να μην υπάρχει επίδραση στην συνολική μορφολογία του φυτού από αλληλόμορφα διαφορετικών γονιδιακών θέσεων.
- δ) Χαμηλή ή μηδενική αλληλεπίδραση μεταξύ των δεικτών.

Τα χαρακτηριστικά των μορφολογικών δεικτών απέχουν πολύ από τα παραπάνω.

Έχουμε φαινόμενα κυριαρχίας, πλειοτροπίας, επίστασης, καθυστερημένη έκφραση του γονιδίου, επιβλαβείς επιδράσεις και μικρό πολυμορφισμό.

Παρόλα αυτά δεν έχει εγκαταλειφθεί η χρήση τους. Γίνονται μελέτες ελέγχου σύνδεσης μεταξύ μορφολογικών και μοριακών δεικτών καθώς και των αντίστοιχων κλασικών και σύγχρονων γενετικών χαρτών για να καταρτιστούν συνδυασμένοι ή ολοκληρωμένοι γενετικοί χάρτες. Για παράδειγμα στο ρύζι, γίνεται προσπάθεια να συσχετιστούν ο κλασικός και ο μοριακός χάρτης ώστε να δημιουργηθεί ένας ολοκληρωμένος γενετικός χάρτης. Μια άλλη χρήση είναι σε μελέτες ταξινόμησης διαφόρων φυτών. Χρησιμοποιούνται για να ταυτοποιηθούν σπάνια υπό εξαφάνιση φυτά για να ελεγχθεί η παραλλακτικότητα που εμφανίζεται σε κάποιους φυσικούς πληθυσμούς ως προς την προέλευση της και για τον έλεγχο της γενετικής διάβρωσης στους πληθυσμούς των συστηματικά καλλιεργούμενων φυτών (**Μαυρομάτης, 2005**).

### **3.2.2. Βιοχημικοί δείκτες.**

Οι βιοχημικοί δείκτες χρησιμοποιούνται συνήθως σε φυτικά προγράμματα για ταυτοποιήσεις γενοτύπων. Μπορούμε να ξεχωρίσουμε διαφορές μεταξύ δυο ποικιλιών, ενώ περαιτέρω χαρακτηριστικά που μπορούν να μελετηθούν είναι η σημαντικότητα του φυτικού είδους ως καλλιέργεια, η φυτοπαθοδιαγνωστική, η

παραγωγή των κατάλληλων υβριδίων και η γενετική καθαρότητα των σπόρων(αυτό- και σταυρο-γονιμοποιούμενων φυτών).

Τα ισοένζυμα αποτελούν ένα σπουδαίο τμήμα της ενζυμολογίας και χαρακτηριστικό της βιοχημικής οργάνωσης των ζωντανών συστημάτων. Οι οργανισμοί συνθέτουν τα ένζυμα σε πολλαπλούς μοριακούς τύπους που αποτελούν ισοένζυμα ενός ενζύμου. Κάθε ισοένζυμο διεκπεραιώνει την ίδια ενζυματική αντίδραση αλλά με τον δικό του τρόπο για να ικανοποιήσει τις ειδικές μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου.

Ο οργανισμός μπορεί να ανταποκριθεί στην ανάγκη για μοριακή πολυπλοκότητα, με δυο τρόπους παραγωγής ισοενζύμων:

- α) Γενετικά με κωδικοποίηση διαφορετικών πολύπεπτιδίων.
- β) Επίκτητη τροποποίηση.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί επτά διαφορετικοί τρόποι παραγωγής ισοενζυμικών συστημάτων στους οργανισμούς:

- 1) Γενετικά ανεξάρτητες πρωτεΐνες κωδικοποιημένες από ξεχωριστά γονίδια.
- 2) Πολυμερή ισοενζυμικά συστήματα στα οποία οι υπομονάδες κωδικοποιούνται σε περισσότερες από μια θέσεις. Σχηματίζονται ετεροπολυμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από διαφορετικές υπομονάδες.
- 3) Ισοένζυμα κωδικοποιημένα σε αλληλόμορφα γονίδια.
- 4) Ισοενζυμικά συστήματα που σχηματίζονται από τις σειρές των πολυμερών μιας απλής υπομονάδας.
- 5) Ισοενζυμικά συστήματα που σχηματίζονται με επίκτητες τροποποιήσεις των αρχικών πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικό συνδυασμό της πρωτεΐνης με άλλα μόρια.
- 6) Μερική πρωτεόλυση του αρχικού πολυπεπτιδίου συνηθισμένη στις πεπτιδάσες.
- 7) Διαφορές στη διαμόρφωση της ίδιας πρωτεΐνης.

Τα ισοένζυμα είναι κοινά ένζυμα που υπάρχουν στα κύτταρα των φυτών με την ίδια ενζυματική λειτουργία και η δράση τους βασίζεται στην διαφορετική κινητικότητα των πρωτεϊνών στο πύκνωμα. Το τμήμα μετουσίωσης στα πηκτώματα διευκρινίζει τη δευτερογενή και τριτογενή δομή των ενζύμων. Οι πολυμορφικές διαφορές που εμφανίζονται στα επίπεδα των αμινοξέων, επιτρέπουν τον πολυμορφισμό των πεπτιδίων που ανιχνεύονται και που χρησιμοποιούνται ως πολυμορφικοί βιοχημικοί δείκτες.



Οι βιοχημικοί δείκτες είναι ανώτεροι από τους μορφολογικούς δείκτες λόγω του ότι είναι γενικά ανεξάρτητοι από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Το μόνο πρόβλημα με τη χρήση των ισοενζύμων και στην επιλογή με τη βοήθεια δεικτών, είναι ότι έχουν περιορισμένη κάλυψη γονιδιώματος και επειδή οι περισσότερες εμπορικές ποικιλίες είναι συγγενείς, τα ισοένζυμα δεν δίνουν πολλούς πολυμορφισμούς (**Φανουράκης, 2002**).

Αρκετοί βιοχημικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να γίνει επιλογή ανθεκτικών γενοτύπων. Ένας από αυτούς είναι το ένζυμο περοξειδάση το οποίο έχει συσχετιστεί με γενετικές αντοχές των φυτών. Για την τομάτα η δραστηριότητα του ενζύμου συσχετίζεται με το γονίδιο Ve, που ελέγχει την αντοχή στον μύκητα *Verticillium*. Το ισοένζυμο περοξειδάση του ασκορβικού οξέος (APX) που παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα τελευταία (AOS-ενεργά είδη οξυγόνου) παράγονται σε συνθήκες stress από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Ο χαρακτηρισμός των APX ισοενζύμων και η αποτελεσματική ανάλυση των κλώνων τους, επέτρεψαν τη διερεύνηση και την εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων πάνω στις ουσίες αυτές. Οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ένας ενδογενής μηχανισμός παραγωγής APX σε μεγάλα επίπεδα, θα έκανε τα κύτταρα πολύ ανθεκτικά σε stress που προέρχεται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (**Φανουράκης, 2002**).

### **3.2.3. Μοριακοί δείκτες.**

Οι δείκτες που βασίζονται στο DNA ονομάζονται μοριακοί και μπορούν να προσδιοριστούν όχι μόνο σε επίπεδο φυτού αλλά και σε επίπεδο ιστού ή κυττάρου (**Φανουράκης, 2002**).

Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA χωρίς άμεση επίδραση από το περιβάλλον. Δεν εξαρτώνται από τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού και μπορούν να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (**Χατζόπουλος, 2001**).

Είναι μια άμεσα ανιχνεύσιμη αλληλουχία DNA ή πρωτεϊνών, των οποίων η κληρονομικότητα μπορεί να ελεγχθεί, αφού βασίζονται στους φυσικά εμφανιζόμενους πολυμορφισμούς των ακολουθιών του DNA (**Φανουράκης, 2002**).

Στα φυτά οι μοριακοί δείκτες μπορούν να έχουν εφαρμογές στην μελέτη του γενετικού τους υπόβαθρου και σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης φυτών.

Η πρώτη περίπτωση περιλαμβάνει την δημιουργία γενετικών χαρτών ολόκληρου του γενόματος των φυτών και τον εντοπισμό των γενετικών θέσεων που φέρουν γονίδια χρήσιμα στην φυτοτεχνία καθώς επίσης και στην απομόνωση των γονιδίων αυτών.

Η δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνει την ταξινόμηση του γενετικού υλικού με βάση την παρουσία ή απουσία των μοριακών δεικτών, την ταυτοποίηση ποικιλιών, την πιστοποίηση της γνησιότητας και της υγιεινής κατάστασης του πολλαπλασιαστικού υλικού, την ανάλυση και τον διαχωρισμό των QTL σε απλά χαρακτηριστικά.

Με τον όρο μοριακή βελτίωση των φυτών εννοούμε την ανάλυση των απογόνων των διασταυρώσεων ή των ατόμων ενός πληθυσμού ως προς ένα γνώρισμα, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια των μοριακών δεικτών.

Οι μοριακοί δείκτες παρουσιάζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με τους άλλους γενετικούς δείκτες. Αυτά είναι:

- 1) Φθηνή μεθοδολογία ανίχνευσης
- 2) Ο μεγάλος αριθμός τους ο οποίος μπορεί να περιγραφεί σε ένα συγκεκριμένο γενετικό υλικό επειδή μπορεί να εμφανίζονται λόγω μικρών μεταβολών στο DNA.
- 3) Δεν προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο φαινότυπο του φυτού.
- 4) Συνδέονται με την παρουσία συγκεκριμένων αλληλομόρφων σε ένα γονίδιο, αφού οι μεταβολές στο DNA μπορεί να αφορούν στην αλυσίδα DNA που κωδικοποιεί το αλληλόμορφο.
- 5) Αξιοποιούνται στην απομόνωση των γονιδίων γιατί η αλληλουχία τους προσδιορίζεται εύκολα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μεθόδους (Φανουράκης, 2002).

### 3.2.4. Χαρακτηριστικά των μοριακών δεικτών.

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίηση τους στα προγράμματα βελτίωσης όπως σε προγράμματα ταυτοποίησης και πιστοποίησης του γενετικού υλικού. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται εξελίσσονται συνεχώς και η χρήση της μιας ή της άλλης εξαρτάται από το ποσοστό επιθυμίας σάρωσης των χρωμοσωμάτων με μοριακούς δείκτες, από τον χρόνο, από το κόστος αλλά και από τον τύπο της διασταύρωσης καθώς και τον βαθμό ετεροζυγωτίας.

Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα:

- 1) Παρουσία πολυμορφισμού.
- 2) Απλή κληρονομικότητα που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχα αλληλόμορφα.
- 3) Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που εμφανίζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
- 4) Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα όταν τα φυτά αναπτυχθούν τόσο ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.
- 5) Μεγάλη διασπορά και την ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- 6) Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου των φυτών (**Williams & Kybelik, 1990**).

### 3.2.5. Εφαρμογές των μοριακών δεικτών.

Οι εφαρμογές των μοριακών δεικτών μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες.

Η πρώτη περιλαμβάνει τη βασική γνώση της λειτουργίας του γενετικού υπόβαθρου κάποιου οργανισμού και η δεύτερη την άμεση εφαρμογή στα προγράμματα βελτίωσης.

Η πρώτη κατηγορία μπορεί να διακριθεί σε δυο κύριες ομάδες:

A) Δημιουργία υψηλής πυκνότητας γενετικού χάρτη με μοριακούς δείκτες που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα φυτά *Arabidopsis*, ρύζι, καλαμπόκι, κριθάρι.

B) Εντοπισμός γενετικών τόπων που φέρουν γονίδια και κλωνοποίηση των συγκεκριμένων γονιδίων. Η απομόνωση των γονιδίων γίνεται για να διερευνηθεί η λειτουργία τους (**Flavell, 1995**).

Η δεύτερη κατηγορία μπορεί να διαιρεθεί στις ακόλουθες κύριες ομάδες:

1) Ταξινόμηση τράπεζας γενετικού υλικού, ταυτοποίηση ποικιλιών και πιστοποίηση γνησιότητας υβριδίων και υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού με χρήση μοριακών δεικτών που συμπεριλαμβάνουν ή αποκλείουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά γνωρίσματα.

2) Πρόβλεψη της απόδοσης των υβριδίων και του γενετικού υπόβαθρου των γονέων. Επιλογή γονέων με βάση την γνωστή γενετική υπόσταση τους που προκύπτει από τους κοινούς και τους μη κοινούς μοριακούς δείκτες. Έτσι ελαττώνεται σημαντικά και ο αριθμός των γονέων με αποτέλεσμα την ελάττωση του αριθμού των διασταυρώσεων.

3) Ταυτοποίηση ανασυνδυασμού και ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των επαναδιασταυρώσεων. Η μεταφορά επιθυμητών γονιδίων από τον γονέα-δότη, συνήθως, επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη μεταφορά μη επιθυμητών γενετικών τόπων που συνήθως δεν είναι άμεσα εμφανίσιμοι. Για την απομάκρυνση τους απαιτούνται διαδοχικές διασταυρώσεις που μέσω ανασυνδυασμού θα αντικατασταθούν με DNA του δέκτη. Η δημιουργία τέτοιου ανασυνδυασμού ταυτοποιείται πολύ πιο εύκολα και γρήγορα με την χρήση μοριακών δεικτών.

4) Ταυτοποίηση και αξιοποίηση του γενετικού υπόβαθρου των άγριων ειδών.

Μετά από διασταυρώσεις το γενετικό απόθεμα των άγριων ειδών αναγνωρίζεται και ταυτοποιείται με σχετική ευκολία στα καλλιεργούμενα φυτά αυξάνοντας έτσι την γενετική παραλλακτικότητα και τα περιθώρια βελτίωσης ορισμένων χαρακτηριστικών.

5) Ανάλυση και διαχωρισμός των QTL σε απλά κληρονομικά χαρακτηριστικά (Glick & Pasternak, 1998).

### 3.2.6. Τύποι μοριακών δεικτών και εφαρμοσμένες τεχνικές.

Οι μοριακές τεχνικές χωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

- α) Σε αυτές που δεν βασίζονται στην PCR (RFLPs) και
- β) Σε αυτές που βασίζονται στην τεχνική PCR (RAPDs, SSRs, AFLPs).

#### 3.2.6.1. Τεχνικές που δεν βασίζονται στην PCR.

**RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms):** Πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA.

Οι RFLPs χρησιμοποιούν περιοριστικά ένζυμα που κόβουν τα μόρια του DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ομόλογων περιοχών του DNA. Τα τμήματα DNA που έχουν κοπεί από το περιοριστικό ένζυμο διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Cai et al., 1994).

Κατόπιν μεταφέρονται σε μεμβράνη από νιτροκυτταρίνη ή νάυλον όπου ακινητοποιούνται. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε συγκεκριμένα διαλύματα που περιέχουν ανιχνευτές του DNA. Η σύνδεση (υβριδοποίηση) των τμημάτων του DNA με τον ανιχνευτή ελέγχεται με βάση την σήμανση του ανιχνευτή με κάποιο ραδιενεργό στοιχείο (φώσφορος 32). Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι DNA κλωνοποιημένο από κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο, τυχαία τμήματα γενωμικού DNA, κάποιο ολιγονουκλεοτίδιο (Χατζόπουλος, 2001).

Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση περιοχών του γονιδιώματος με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Σε πολλά είδη φυτών έχει γίνει ανάλυση της σύνδεσης των δεικτών RFLP. Στην βελτίωση των φυτών η ανάλυση με την μεθοδολογία RFLP είναι αποδεκτή και χρησιμοποιείται ευρύτατα. Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιούνται επίσης και στην εκτίμηση της ποικιλομορφίας σε τράπεζες γενετικού υλικού. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιορίζεται γιατί απαιτεί αρκετή εργασία, είναι χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος εφαρμογής (Robertson & Treuven, 2000).

Η μέθοδος στηρίζεται στον πολυμορφισμό των μοριακών δεικτών. Τέτοιος πολυμορφισμός είναι δύσκολο να φανεί μεταξύ ποικιλιών ή ατόμων του ίδιου είδους.

Σε γενικές γραμμές οι αναλυτικές διαδικασίες που απαιτούνται για τον εντοπισμό και την δημιουργία των RFLP δεικτών είναι:

- 1) Εξαγωγή του DNA.
- 2) Πέψη του DNA.
- 3) Χωρισμός των τεμαχίων – Μεταφορά των τεμαχίων.
- 4) Υβριδοποίηση των τεμαχίων.
- 5) Απεικόνιση των πολυμορφισμών (**Μαυρομάτης, 2005**).

Τα πλεονεκτήματα των δεικτών RFLP, είναι:

- 1) Υψηλή επαναληψιμότητα
- 2) Συγκυρίαρχοι δείκτες
- 3) Υψηλή δυνατότητα αναπαραγωγής
- 4) Τυχαία διανομή σε όλο το γονιδίωμα

Τα μειονεκτήματα των δεικτών είναι:

- 1) Υψηλό κόστος ανάλυσης
- 2) Μεγάλες ποσότητες DNA
- 3) Χρονοβόρα τεχνική
- 4) Συνήθως χρησιμοποιείται ραδιενέργεια (**Σκαράκης, 2005**).

### **3.2.6.2. Τεχνικές που βασίζονται στην PCR.**

**RAPDs**(Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA).

Η μέθοδος RAPD είναι μια τεχνική που βασίζεται στην ενίσχυση του DNA με τυχαίους εκκινήτες που περιέχουν τουλάχιστον 50% G και C, για αυτό είναι απαραίτητο να διατηρούνται και να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες αντίδρασης.

Παράγοντες όπως συγκέντρωση του DNA, η συγκέντρωση μαγνησίου, η θερμοκρασία αναδόμησης του εκκινήτη και η σύνθεση των βάσεων του εκκινήτη επηρεάζουν την αντίδραση για αυτό και θα πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά. Τα προϊόντα χωρίζονται εύκολα από τα πρότυπα ηλεκτροφόρησης και απεικονίζονται κάτω από υπεριώδη φωτισμό με την βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου σε πηκτή αгарόζης. Οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται οφείλονται σε διαφορές στην θέση ή

στις θέσεις δέσμευσης των τυχαίων εκκινητών ή σε διαφορές στο τμήμα του γενωμικού DNA που ενισχύεται με την PCR. Ο πολυμορφισμός μεταξύ των ατόμων, των ποικιλιών κλπ. Εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών του DNA στην ηλεκτροφόρηση και μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην αλληλουχία περιοχών του DNA που έχουν ενωθεί με τον εκκινητή ή σε χρωμοσωμικές διαφορές που επηρεάζουν τις πολλαπλασιαζόμενες περιοχές (**Tingey & Rafalsky, 1990**).

Οι δείκτες RAPD συμπεριφέρονται σαν κυρίαρχοι χαρακτήρες, εμφανίζονται σε ομόζυγη ή σε ετερόζυγη κατάσταση στην επόμενη γενιά που περιέχει το αλληλόμορφο που ενισχύεται και δεν εμφανίζεται στην γενιά που είναι ομόζυγη για το αλληλόμορφο που δεν ενισχύεται.

Η ιδιότητα αυτή μπορεί να οδηγεί σε μερική χρησιμότητα της μεθολογίας RAPD για την ανάλυση των γενεαλογικών δένδρων της F<sub>2</sub> επαναδιασταύρωσης.

Τα κύρια πλεονεκτήματα των δεικτών RAPD είναι:

- 1) Ευκολία, ταχύτητα και το χαμηλό κόστος
- 2) Η ποσότητα του DNA που απαιτείται συνήθως είναι μικρή(5-50ng ανά αντίδραση).
- 3) Έχουν μεγάλη γενωμική αφθονία
- 4) Κατανέμονται τυχαία σε όλο το γένωμα (**Spooner et al., 2005**).

Τα μειονεκτήματα είναι:

- 1) Χαμηλή επαναληψιμότητα (**Schierwater & Ender, 1993**)
- 2) Απαιτείται DNA υψηλού μοριακού βάρους
- 3) Απαιτούνται ειδικές προφυλάξεις για την μη μόλυνση του DNA(**Williams & Kubelik, 1990**).

Οι RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας μέσα στα είδη για να δείξουν τις σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών.

Η ταχύτητα, η αποτελεσματικότητα και η αυτοματοποίηση κάνουν την μεθοδολογία των RAPDs την πιο κατάλληλη μέθοδο για την αποτελεσματική διαχείριση του γενετικού υλικού με σκοπό την εκτίμηση της παραλλακτικότητας, τον έλεγχο της γενετικής διάβρωσης και το διπλασιασμό των συλλογών του γενετικού υλικού (**Virk et al., 1995**)

**SSRs(Simple Sequence Repeats):** Μικροδορυφόροι ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.

Οι ακολουθίες DNA με 2, 3, 4 επαναλαμβανόμενες ακολουθίες νουκλεοτιδίων περιγράφονται ως μικροδορυφόροι ή απλές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες. Αυτοί οι δείκτες επειδή είναι συγκυρίαρχοι και επαναλήψιμοι, είναι ιδανικοί για τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος και για τη γενετική μελέτη των πληθυσμών (**Dayanandan et al., 1998**).

Παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό και συχνά έχουν αρκετά ευδιάκριτη αλληλομορφία ανά τόπο και υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των άκρων τους (**Χατζόπουλος, 2001**).

Το πλεονέκτημα αυτό επιτρέπει την εύκολη διάκριση των ετεροζύγων ατόμων. Η ταυτοποίηση κατάλληλων γενετικών τόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες, απαιτεί εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης συγκεκριμένων τμημάτων του DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Αυτό είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα γιατί απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, αρκετό χρόνο και έχει μεγάλο κόστος (**Χατζόπουλος, 2001**).

Οι μικροδορυφόροι παρέχουν πολλές πληροφορίες για την μελέτη των γενετικών σχέσεων μεταξύ στενά συνδεδεμένων φυτικών ειδών καθώς και μεταξύ υποπληθυσμών ενός είδους λόγω του εξαιρετικά υψηλού βαθμού πολυμορφισμού (**Bowcock et al. 1994**).

Είναι συγκυρίαρχοι δείκτες και η ανάλυση τους μπορεί να αυτοματοποιηθεί (**Hernandez et al., 2002**). Τέλος θεωρούνται ως ιδανικοί δείκτες για την χαρτογράφηση του γενώματος (**Morgante & Olivieri, 1993**).

**AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms):** Πολυμορφισμοί μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA.

Οι AFLPs είναι τμήματα DNA που προκύπτουν μετά από την δράση περιοριστικών ενζύμων στο γενωμικό DNA ενός οργανισμού και ενισχύονται (πολλαπλασιάζονται) με την βοήθεια της PCR. Οι εκκινητές της PCR αποτελούνται από μια βασική αλληλουχία, ένα περιοριστικό ένζυμο συγκεκριμένης αλληλουχίας και 1-5 εκλεκτικά



νουκλεοτίδια. Όσο πιο μεγάλος ο αριθμός των νουκλεοτιδίων τόσο λιγότερες οι ζώνες που προκύπτουν. Οι ζώνες είναι αποτέλεσμα διαφορών στα σημεία που κόβουν τα ένζυμα ή μεταξύ των σημείων αυτών. Τα προϊόντα της PCR αναλύονται ηλεκτροφορητικά σε πήγματα πολυακρυλαμιδίου όπου οι πολυμορφισμοί αποκαλύπτονται από τις διαφορές στο μοριακό μέγεθος των τμημάτων του ενισχυμένου DNA (Spooner et al., 2005).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- 1) Υψηλή αφθονία στο γένωμα.
- 2) Μεγάλη επαναληψιμότητα.
- 3) Παραγωγή μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών.
- 4) Μεγάλος εύρος εφαρμογής.
- 5) Δεν απαιτούνται δεδομένα αλληλούχησης για την κατασκευή των εκκινήτων.
- 6) Η ανάλυση τους είναι αυτοματοποιημένη.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- 1) Απαιτούν DNA καθαρό και υψηλού μοριακού βάρους
- 2) Είναι κυρίαρχοι δείκτες.
- 3) Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού και της διαφορετικής συχνότητας των ζωνών είναι αναγκαίο να δημιουργηθούν ακριβή αλλά υποκειμενικά κριτήρια για την αποδοχή των ζωνών κατά την ανάλυση.

Οι AFLPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες που σχετίζονται με γενετικές ταυτοποιήσεις, με την καταγωγή, την αναγνώριση κλώνων και ποικιλιών καθώς και σε φυλογενετικές μελέτες στενά συνδεδεμένων ειδών. Η υψηλή γενωμική τους αφθονία και η τυχαία κατανομή τους σε όλο το γονιδίωμα, τους κάνει πού χρήσιμους στη δημιουργία γενετικών χαρτών (Vos et al., 1995).

### **3.2.7. Εφαρμογές των μοριακών δεικτών RAPDs.**

Οι εφαρμογές στην έρευνα που προκύπτουν από τη χρήση των μοριακών δεικτών RAPDs είναι αρκετές και έχουν σχέση με την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας του γενετικού υλικού, με τη γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών και την ανάλυση των φυλογενετικών τους σχέσεων, τη γενετική χαρτογράφηση.

Οι δείκτες RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στο τομέα της έρευνας που αφορά την γενετική των πληθυσμών (Hedrick, 1992).

Έχουν χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσουν το γενετικό αποτύπωμα DNA για να μελετηθεί έτσι η ατομική ταυτότητα και η ταξινομική σχέση στους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς (**Wilde et al., 1992**).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει την χρησιμότητα των RAPDs ως πηγή φυλογενετικών πληροφοριών. Με την χρήση δεικτών RAPD έγινε δυνατό να ελεγχθεί η διειδική ροή των γονιδίων μεταξύ των ειδών *Iris fulva* και *Iris hexagona* και να μελετηθεί η καταγωγή του υβριδίου *Iris nelsonii* (**Arnold et al., 1991**).

Η ιχνηλάτηση των φυτών έχει πολλές εφαρμογές στο εμπόριο και σε νομικές υποθέσεις. Σε αυτό περιλαμβάνεται η χρήση της σε βελτιωτικά προγράμματα για να καθοριστεί η συγγένεια των γενοτύπων και η πιστοποίηση των απογόνων. Μπορούν να χρησιμεύσουν στην δημιουργία, την απόκτηση και την ενίσχυση των ιδιοκτησιακών δικαιωμάτων στα φυτά (**Jondle, 1992**).

Η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης στα κωνοφόρα ήταν αρχικά αργή λόγω του μεγάλου μεγέθους του γενώματος και λόγω της έμφυτης δυσκολίας παραγωγής διασπώμενου F<sub>2</sub> πληθυσμού. Η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα της RAPD ανάλυσης έχει συνεισφέρει ιδιαίτερα στην χαρτογράφηση των κωνοφόρων (**Carlson et al., 1991**).

Μια από τις πρώτες εφαρμογές των δεικτών RAPD ήταν η δημιουργία γενετικών χαρτών υψηλής πυκνότητας. Πάνω από 250 νέοι γενετικοί δείκτες τοποθετήθηκαν σε μια καθαρή σειρά *Arabidopsis thaliana* (**Reiter et al., 1992**).

## 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. Προετοιμασία του γενετικού υλικού.

Το γενετικό υλικό της εργασίας αποτέλεσαν 20 γενότυποι χαλέπιου πεύκης που προέρχονταν από φυσικούς πληθυσμούς *Pinus halepensis* από την περιοχή της Χαλκιδικής (10 γενότυποι) και από την περιοχή της Εύβοιας (10 γενότυποι). Οι 5 γενότυποι της Χαλκιδικής και της Εύβοιας παρήγαγαν υψηλή ποσότητα ρητίνης (High resin) και οι υπόλοιποι 5 παρήγαγαν χαμηλή ποσότητα ρητίνης (Low resin). Για την μελέτη των γενοτύπων με μοριακούς δείκτες τύπου RAPD ελήφθησαν δείγματα σπόρων από φυσικούς πληθυσμούς *Pinus halepensis* από τις περιοχές της Χαλκιδικής και της Εύβοιας. Από κάθε γενότυπο πάρθηκε ποσότητα σπόρων ώστε να γίνει η εξαγωγή DNA με σκοπό την εύρεση γενετικής συγγένειας. Είκοσι σπόροι ανά γενότυπο τοποθετήθηκαν για 4 μέρες σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9mm, σε διηθητικό χαρτί whatmann 3mm εμποτισμένου με 5ml νερό, μέχρι να αρχίσουν να βλαστάνουν και να φανεί το ριζίδιο. Κατόπιν το έμβryo απομακρύνθηκε με νυστέρι και το απλοειδές ενδοσπέρμιο χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του DNA. Δείγμα ενδοσπερμίου από 5 σπόρους χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του DNA από κάθε γενότυπο. Το ενδοσπέρμιο της χαλέπιου πεύκης είναι απλοειδές και προέρχεται αποκλειστικά από το μητρικό φυτό.

### 4.2. Απομόνωση του DNA.

Το DNA απομονώθηκε από το απλοειδές ενδοσπέρμιο πέντε σπόρων ανά γενότυπο *Pinus halepensis*, στους οποίους αφού απομακρύνθηκε με νυστέρι το έμβryo. Για κάθε γενότυπο χρησιμοποιήθηκαν 5 σπόροι για την εξαγωγή του DNA. Το ενδοσπέρμιο από 5 σπόρους για κάθε γενότυπο ομογενοποιήθηκε σε υγρό άζωτο. Προστέθηκαν 600μl 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1% w/v SDS ή σαρκosύλ, 100 μg/ml πρωτεϊνάση K, 1-2% PVPP ή PVP, 10-30 mM β-μερκαπτοαιθανόλη ή 1-10 mM DTT. Το παρασκεύασμα επώαστηκε στους 37°C-60°C επί 1-2 h. Τα αδιάλυτα συστατικά απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 10.000 xg επί 10 min.

Προστέθηκε RNάση I σε τελική συγκέντρωση 1-100 μg/ml και το παρασκεύασμα επώαστηκε επί 1 h στους 25°C-40°C για καταστροφή του RNA. Απομακρύνθηκαν οι πρωτεΐνες με μία εκχύλιση φαινόλης, ακολουθούμενη από δύο εκχυλίσεις φαινόλης/χλωροφορμίου και μία εκχύλιση χλωροφορμίου.

Προστέθηκαν στην υδατική φάση 2.5 όγκοι  $-20^{\circ}\text{C}$  αιθανόλης ή ένας όγκος  $-20^{\circ}\text{C}$  ισοπροπανόλης και 1/10 όγκοι 3M οξικού νατρίου pH 5-5.5. Το παρασκεύασμα επαφίεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  επί 1-16 h. Κατά τον χρόνο αυτό τα μόρια του DNA συσσωματώνονται σε αδιάλυτα σύμπλοκα. Η συσσωμάτωση αυτή υποβοηθείται από την οξינוποίηση του διαλύματος λόγω της αφαίρεσης του αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου του DNA πού αυτή συνεπάγεται. Το προστιθέμενο άλας επίσης υποβοηθά την συσσωμάτωση λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης του DNA. Όμως, η αλκοόλη είναι η κύριος παράγων δημιουργίας συσσωματωμάτων, λόγω της αφυδάτωσης πού προκαλεί. Το DNA παραλήφθηκε σαν ίζημα μετά από φυγοκέντρωση στα 10.000 xg επί 10 min. Στο ίζημα προστίθεται 1-2 ml 70%  $-20^{\circ}\text{C}$  αιθανόλης. Πλύθηκαν με αυτή τα τοιχώματα του σωλήνα και φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 xg επί 5 min. Η πλύση αυτή αποσκοπεί στο να απομακρυνθούν ίχνη του άλατος. Επαναλήφθηκε η πλύση με  $-20^{\circ}\text{C}$  98%-100% αιθανόλη. Το τελικό ίζημα αποξηράνθηκε με ελαφρά ροή αζώτου.

Το ξηρό ίζημα διαλύεται σε 10-500  $\mu\text{l}$  TE ή αποστειρωμένου ύδατος και φυλάσσεται σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ . Ένας μικρός όγκος του DNA (π.χ 2.5  $\mu\text{l}$ ) αναμιγνύεται με 1ml αποστειρωμένου ύδατος, τέθηκε εντός κυψελίδας πάχους 1 cm, από χαλαζία, και η απορρόφηση του παρασκευάσματος μετρήθηκε στα 260, 280, 230, 310 nm με νερό σαν διάλυμα αναφοράς. Μία μονάδα απορρόφησης στα 260 nm (OD260) ισούται με συγκέντρωση DNA στο παρασκεύασμα 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Επομένως η συγκέντρωση DNA στο αρχικό παρασκεύασμα, από το οποίο ελήφθη ο μικρός όγκος για την μέτρηση, δίδεται από τον τύπο:

$$X = 50\text{mg}/\text{ml} * (A/1) * (V_{\text{διαλ}}/V_{\text{DNA}})$$

$V_{\text{DNA}}$  = όγκος του δείγματος DNA πού αναμίχθηκε με τον διαλύτη (νερό) για τις μετρήσεις.  
 $V_{\text{διαλ}}$  = όγκος του διαλύτη (νερό στην περίπτωση μας) πού αναμίχθηκε με το μικρό δείγμα DNA.  $A$ =τιμή στο φάσμα απορρόφησης 260nm(OD260). Το καθαρό DNA έχει λόγο απορροφήσεων  $\text{OD}260 / \text{OD}280 = 1.8$ . Μικρότερες τιμές υποδηλώνουν την παρουσία πρωτεϊνών. Ένας λόγος ίσος με 1.5 σημαίνει την παρουσία πρωτεϊνών σε ποσοστό 50%. Η παρουσία πολυσακχαριτών υποδηλώνεται από τον λόγο  $\text{OD}260 / \text{OD}230$ . Για την λήψη καθαρού DNA αυτός ο λόγος είναι ίσος με 2. Μικρότερες τιμές υποδηλώνουν την παρουσία πολυσακχαριτών. Οποιαδήποτε απορρόφηση στα 310 nm υποδηλώνει την παρουσία και άλλων ουσιών πολυαρωματικών ή με συζυγείς δεσμούς, πιθανώς παρεμποδιστικών των μετέπειτα αντιδράσεων.

### 4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση.

Κατά την μοριακή ανάλυση των γενοτύπων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 48 δεκαμερείς εκκινητές (primers) με τυχαία νουκλεοτιδική ακολουθία, των σειρών OPG, OPF και OPD (πίνακας 1) της εταιρείας OPERON.

Πίνακας 1. Τύπος και αλληλουχία των 48 RAPD εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στους 20 γενότυπους.

RAPD Εκκινητής	Αλληλουχία του εκκινητή	RAPD εκκινητής	Αλληλουχία του εκκινητή	RAPD εκκινητής	Αλληλουχία του εκκινητή
OPG-3	5'-GAGCCCTCCA-3'	OPF-1	5'-ACGGATCCTG-3'	OPD-1	5'-ACCGCGAAGG-3'
OPG-4	5'-AGCGTGTCTG-3'	OPF-2	5'-GAGGATCCCT-3'	OPD-2	5'-GGACCCAACC-3'
OPG-5	5'-CTGAGACGGA-3'	OPF-3	5'-CCTGATCACC-3'	OPD-3	5'-GTCGCCGTCA-3'
OPG-6	5'-GTGCCTAACC-3'	OPF-4	5'-GGTGATCAGG-3'	OPD-4	5'-TCTGGTGAGG-3'
OPG-7	5'-GAACCTAACC-3'	OPF-5	5'-CCGAATTCCC-3'	OPD-5	5'-TGAGCGGACA-3'
OPG-8	5'-TCACGTCCAC-3'	OPF-6	5'-GGGAATTCGG-3'	OPD-6	5'-ACCTGAACGG-3'
OPG-9	5'-CTGACGTCAC-3'	OPF-7	5'-CCGATATCCC-3'	OPD-7	5'-TTGGCACGGG-3'
OPG-10	5'-AGGGCCGTCT-3'	OPF-8	5'-GGGATATCGG-3'	OPD-8	5'-GTGTGCCCCA-3'
OPG-11	5'-TGCCCGTCGT-3'	OPF-9	5'-CCAAGCTTCC-3'	OPD-9	5'-CTCTGGAGAC-3'
OPG-12	5'-CAGCTCACGA-3'	OPF-10	5'-GGAAGCTTGG-3'	OPD-10	5'-GGTCTACACC-3'
OPG-13	5'-CTCTCCGCCA-3'	OPF-11	5'-TTGGTACCCC-3'		
OPG-14	5'-GGATGAGACC-3'	OPF-12	5'-ACGGTACCAG-3'		
OPG-15	5'-ACTGGGACTC-3'	OPF-13	5'-GGCTGCAGAA-3'		
OPG-16	5'-AGCGTCCTCC-3'	OPF-14	5'-TGCTGCAGGT-3'		
OPG-17	5'-ACGACCGACA-3'	OPF-15	5'-CCAGTACTCC-3'		
OPG-18	5'-GGCTCATGTG-3'	OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'		
OPG-19	5'-GTCAGGGCAA-3'	OPF-17	5'-AACCCGGGAA-3'		
OPG-20	5'-TCTCCCTCAG-3'	OPF-18	5'-TTCCCGGGTT-3'		
		OPF-19	5'-CCTCTAGACC-3'		
		OPF-20	5'-GGTCTAGAGG-3'		

Σε κάθε σετ 20 αντιδράσεων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα, 420μl απεσταγμένου νερού, 50μl 10x Taq reaction buffer complete(200mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 20μl από 10-νουκλεοτιδικό RAPD εκκινητή (Operon Tech.), 5μl dNTPs και 20U(4μl) Taq DNA πολυμεράσης. Το μείγμα αυτό διανεμήθηκε σε 20 σωλήνες από 25μl στον καθένα. Οι σωλήνες περιείχαν ήδη 1μl (10ng) DNA-στόχο.

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

40 κύκλοι που αποτελούνται από: Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό. Επικόλληση των εκκινητών στους 40 °C για 1 λεπτό.

Επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 1 λεπτό.

Τελικά το προϊόν της PCR προστίθεται και αναμιγνύεται με 1/5 του όγκου σε διάλυμα επιφόρτισης, αποτελούμενο από 30-50% v/v γλυκερόλη TBE buffer, 0,01% bromophenol blue. Κατόπιν το δείγμα μεταφέρθηκε σε μία εμβάθυνση πήγματος 2% αγαρόζης με την βοήθεια μιας μικροπιπέτας.

Η γλυκερόλη χρησιμεύει στο να καταστήσει το δείγμα του DNA βαρύτερο από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, ώστε να επικάθεται εντός της εμβάθυνσεως του πήγματος χωρίς να εξέρχεται. Το κυανό βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική κυανού χρώματος, η οποία κατά την ηλεκτροφόρηση κινείται μπροστά από τα τεμάχια DNA, ώστε να σταματήσουμε την ηλεκτροφόρηση όταν η χρωστική φθάσει στο άλλο άκρο του πήγματος, και να μην χάσουμε κάποιο από τα τεμάχια DNA. Αναλόγως της συγκέντρωσης της αγαρόζης στο πήγμα, τα τεμάχια DNA μεγέθους 200-50 ζευγών βάσεων κινούνται μαζί με το κυανό της βρωμοφαινόλης. Τα ακόμη μικρότερα τεμάχια προηγούνται αυτής. Για ικανοποιητικό διαχωρισμό του DNA, το ποσό που επιφορτώνεται στην εμβάθυνση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg DNA ανά εμβάθυνση διαστάσεων 2 mm x 5 mm x 4 mm. Το buffer ηλεκτροφόρησης ήταν TBE(10 mM Tris, 10mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, PH 8,1).

Τα προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για κάθε γενότυπο, αναμίχθηκαν με 3μl διαλύματος φόρτωσης και ηλεκτροφορήθηκαν για 1 ώρα σε πηκτή αγαρόζης 2% στην οποία είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο(5μl διαλύματος 10mg/ml για κάθε 100ml πήγματος αγαρόζης). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 100 V. για 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία 360nm για την καταγραφή των πολυμορφισμών των

δειγμάτων και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή μηχανή τύπου Olympus. Στην συνέχεια οι φωτογραφίες περάστηκαν στο H/Y όπου έγινε επεξεργασία τους με το πρόγραμμα photoshop CS3. Στην επεξεργασία των φωτογραφιών ενισχύθηκε η αντίθεση (contrast) και η φωτεινότητα των φωτογραφιών(brightness).

#### 4.4. Στατιστική ανάλυση.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος NTSYS, μετά την κωδικοποίηση των μοριακών δεδομένων. Συγκεκριμένα, η παρουσία ζώνης αντιπροσωπεύθηκε με (1) και η απουσία με (0).

Ο υπολογισμός της γενετικής ομοιότητας των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο του JACCARD  $S_{ij} = a/(a+b+c)$  και του DICE  $S_{ij} = 2a/(a+b+c)$  όπου:

1.  $S_{ij}$ : Η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων i και j.
2. a: Το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων του DNA που είναι παρόντα στο δείγμα i και στο δείγμα j.
3. b: Το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων του DNA που είναι παρόντα στο δείγμα i.
4. c: Το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων του DNA που είναι παρόντα στο δείγμα j.

Με βάση της μήτρες της γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δενδρογράμματα φυλογενετικής σχέσεων με τη μέθοδο Neighbour joining και με την μέθοδο DICE. Τελικά επιλέχθηκε η μέθοδος Neighbour joining ως η καταλληλότερη και πιο αντιπροσωπευτική για τα δείγματα.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

### 5.1 Αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων.

Για την μοριακή ανάλυση του γενόματος χρησιμοποιήθηκαν 48 μονόκλωνοι εκκινητές των σειρών OPG, OPF, OPD της εταιρείας OPERON.

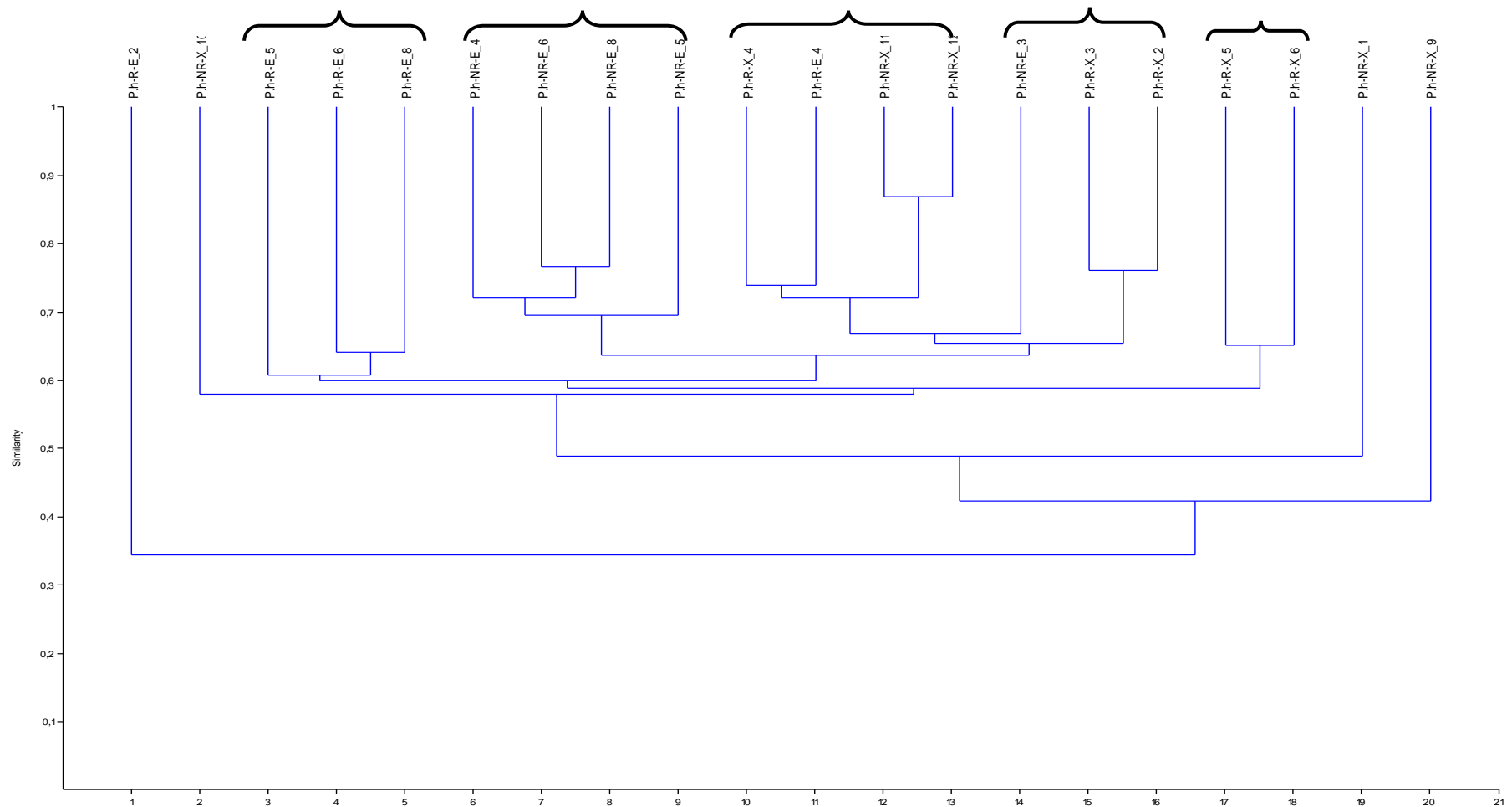
Πίνακας 2. Εκκινητές RAPD που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των 20 γενοτύπων *Pinus halepensis* από την Χαλκιδική και την Εύβοια.

RAPD εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Αριθμός πολυμορφικών ζωνών	Σύλονο ζωνών που πολ/σε ο εκκινητής
OPG-3	5'-GAGCCCTCCA-3'	3	1
OPG-4	5'-AGCGTGTCTG-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPG-5	5'-CTGAGACGGA-3'	2	1
OPG-6	5'-GTGCCCTAACC-3'	5	2
OPG-7	5'-GAACCTAACC-3'	5	3
OPG-8	5'-TCACGTCCAC-3'	9	6
OPG-9	5'-CTGACGTCAC-3'	5	2
OPG-10	5'-AGGGCCGTCT-3'	5	2
OPG-11	5'-TGCCCGTTCGT-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPG-12	5'-CAGCTCACGA-3'	13	7
OPG-13	5'-CTCTCCGCCA-3'	6	3
OPG-14	5'-GGATGAGACC-3'	1	0
OPG-15	5'-ACTGGGACTC-3'	5	2
OPG-16	5'-AGCGTCCTCC-3'	7	2
OPG-17	5'-ACGACCGACA-3'	8	4
OPG-18	5'-GGCTCATGTG-3'	3	1
OPG-19	5'-GTCAGGGCAA-3'	7	2
OPG-20	5'-TCTCCCTCAG-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-1	5'-ACGGATCCTG-3'	3	0
OPF-2	5'-GAGGATCCCT-3'	7	3
OPF-3	5'-CCTGATCACC-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-4	5'-GGTGATCAGG-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-5	5'-CCGAATTCCC-3'	5	2
OPF-6	5'-GGGAATTCGG-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-7	5'-CCGATATCCC-3'	4	4
OPF-8	5'-GGGATATCGG-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-9	5'-CCAAGCTTCC-3'	2	0

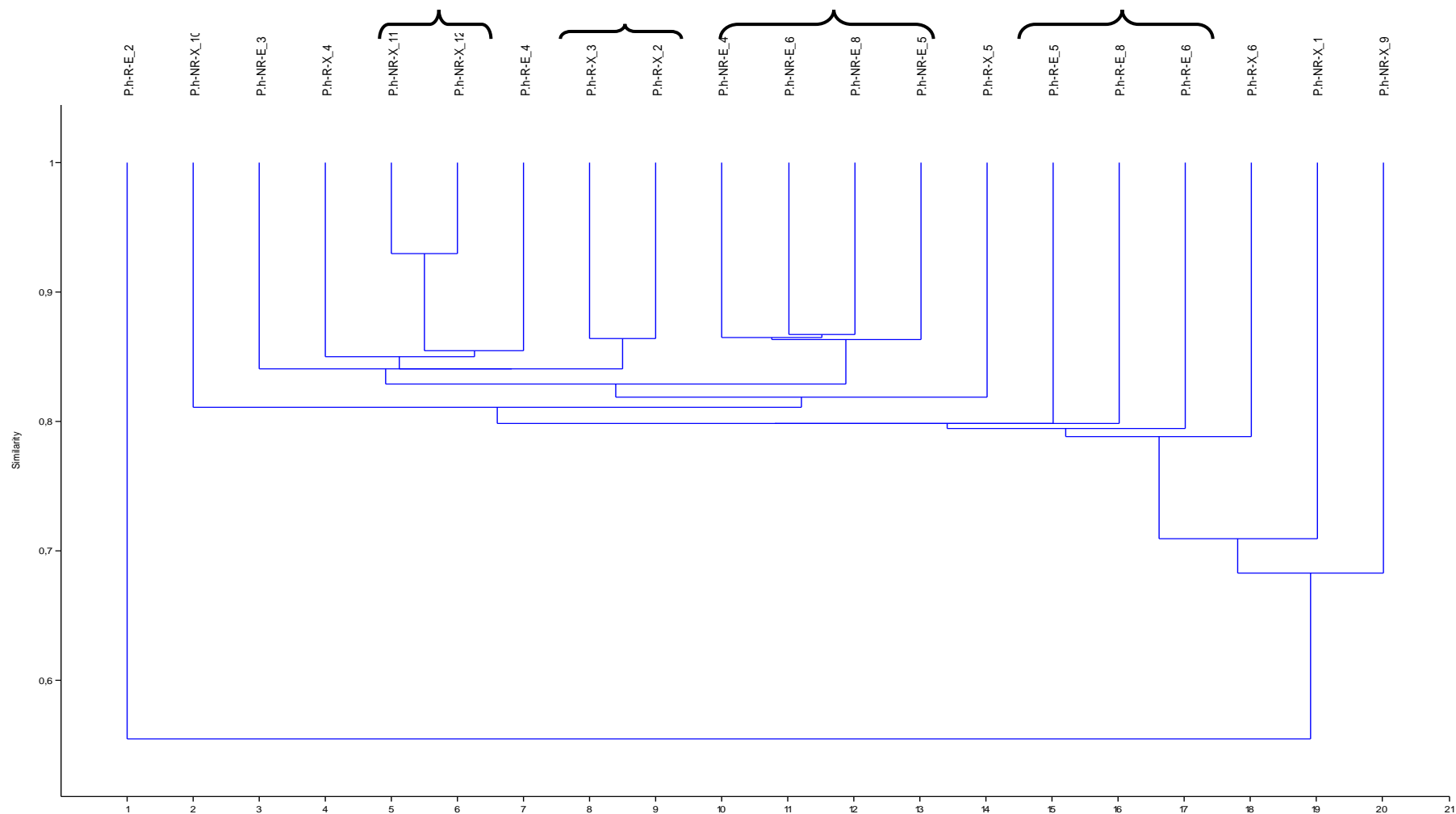


OPF-10	5'-GGAAGCTTGG-3'	8	4
OPF-11	5'-TTGGTACCCC-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-12	5'-ACGGTACCAG-3'	6	3
OPF-13	5'-GGCTGCAGAA-3'	5	5
OPF-14	5'-TGCTGCAGGT-3'	2	0
OPF-15	5'-CCAGTACTCC-3'	5	2
OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'	1	1
OPF-17	5'-AACCCGGGAA-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-18	5'-TTCCCGGGTT-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPF-19	5'-CCTCTAGACC-3'	1	1
OPF-20	5'-GGTCTAGAGG-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPD-1	5'-ACCGCGAAGG-3'	5	2
OPD-2	5'-GGACCCAACC-3'	3	2
OPD-3	5'-GTCGCCGTCA-3'	2	0
OPD-4	5'-TCTGGTGAGG-3'	2	0
OPD-5	5'-TGAGCGGACA-3'	5	3
OPD-6	5'-ACCTGAACGG-3'	8	4
OPD-7	5'-TTGGCACGGG-3'	1	0
OPD-8	5'-GTGTGCCCCA-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPD-9	5'-CTCTGGAGAC-3'	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.	ΔΕΝ ΛΕΙΤ.
OPD-10	5'-GGTCTACACC-3'	1	1
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		<b>160</b>	<b>75</b>
<b>M.O.</b>		<b>4,6</b>	<b>2</b>

Από τους 48 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, οι 13 δεν έδωσαν ζώνες DNA (27%) (ΔΕΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΗΣΑΝ) και δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση που ακολούθησε. Οι υπόλοιποι εκκινητές έδωσαν πολυμορφικές ζώνες, 160 στο σύνολο και κατά μέσο όρο 4,6 ανά εκκινητή. Οι πολυμορφισμοί συνολικά έφτασαν τους 75 και κατά μέσο όρο κυμαίνονταν στους 2 ανά εκκινητή. Ο OPD-12 (5'-CAGCTCACGA-3') παρουσίασε το μεγαλύτερο αριθμό ζωνών (13 ζώνες). Επίσης έδωσε και τον μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών (7 ζώνες).



Εικόνα 3. Δενδρόγραμμα φυλογενετικών σχέσεων των γενοτύπων *Pinus halepensis* (Χαλκιδικής και Εύβοιας) σε ομοειδή σύνολα, βάση της ανάλυσης που προέκυψε με μοριακούς δείκτες τύπου RAPDs και τη μέθοδο UPGMA βάση του δείκτη Jaccard.



Εικόνα 4. Δενδρόγραμμα φυλογενετικών σχέσεων των γενοτύπων *Pinus halepensis* (Χαλκιδικής και Εύβοιας) σε ομοειδή σύνολα, βάση της ανάλυσης που προέκυψε με μοριακούς δείκτες τύπου RAPDs και με τη μέθοδο NEIGHBORJOIN βάση του δείκτη DICE.

Έγινε κωδικοποίηση του μοριακού προτύπου και στη συνέχεια κωδικοποίηση για το σύνολο των γενοτύπων. Ακολούθησε η ηλεκτρονική επεξεργασία των δεδομένων σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα. Η παρουσία των ζωνών αντιπροσωπεύτηκε από την μονάδα και η απουσία από το μηδέν.

Με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης με τη μέθοδο UPGMA και NEIGHBORJOIN με βάση τους δείκτες Jaccard και DICE.

Η ανάλυση των δεδομένων δεν έδωσε πλήρη διαχωρισμό των δυο γενοτύπων (Χαλκιδικής και Εύβοιας) τόσο εντός των πληθυσμών όσο και μεταξύ των γενοτύπων σε γενότυπους υψηλής και χαμηλής ρητίνης όσο και μεταξύ των δυο πληθυσμών των δυο περιοχών. Από τα δένδρογράμματα φαίνεται ότι αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα στους πληθυσμούς της Εύβοιας.

Πιο αναλυτικά: Στο δένδρογράμμα (UPGMA Jaccard) (εικόνα 4) δημιουργούνται 4 σύνολα. Στο 1<sup>ο</sup> σύνολο έχουμε τους τρεις γενότυπους υψηλής ρητίνης της Εύβοιας (P.h-R-E5, P.h-R-E6, P.h-R-E8) οι οποίοι ομαδοποιούνται μαζί, με τον δείκτη συγγένειας να είναι 0,60 κατά UPGMA και 0,62 κατά NEIGHBORJOIN.

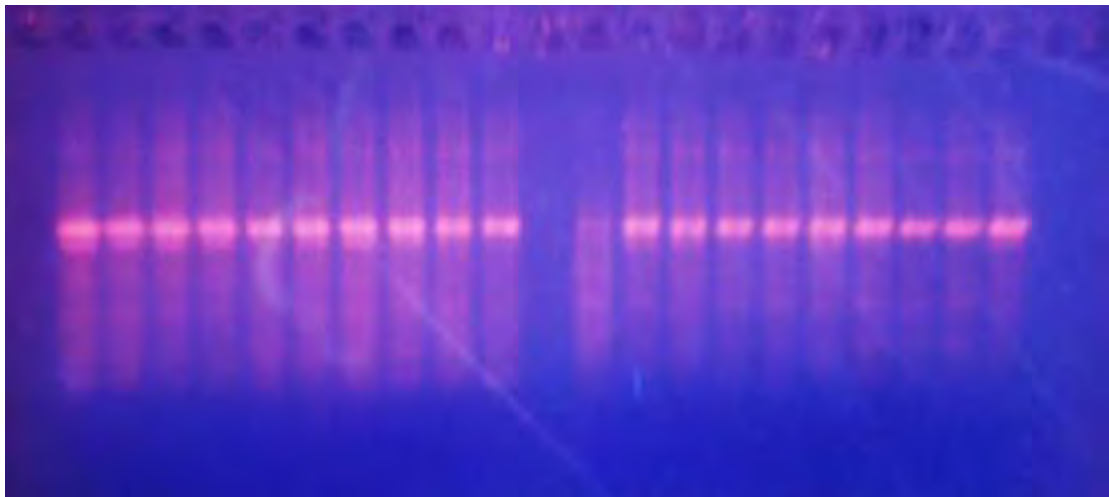
Στο 2<sup>ο</sup> σύνολο 4 γενότυποι χαμηλής ρητίνης της Εύβοιας ομαδοποιούνται μαζί, με τον δείκτη συγγένειας να είναι στο 0,70 (P.h-NR-E4, P.h-NR-E6, P.h-NR-E8, P.h-NR-E5) κατά UPGMA και 0,75 κατά NEIGHBORJOIN.

Στο 3<sup>ο</sup> σύνολο δεν φαίνεται να υπάρχει σαφής διαχωρισμός των γενοτύπων Χαλκιδικής και Εύβοιας, όσο και υψηλής και χαμηλής ρητίνης. Μπορούμε να πούμε ότι υπάρχουν δυο υποσύνολα: στο ένα ομαδοποιούνται δυο γενότυποι χαμηλής ρητίνης της Χαλκιδικής (P.h-NR-X11 και P.h-NR-X12) με δείκτη συγγένειας 0,85 κατά UPGMA και NEIGHBORJOIN και στο άλλο δυο γενότυποι υψηλής ρητίνης (P.h-R-X3 και P.h-R-X2) της Χαλκιδικής με δείκτη συγγένειας 0,75 κατά UPGMA και NEIGHBORJOIN.

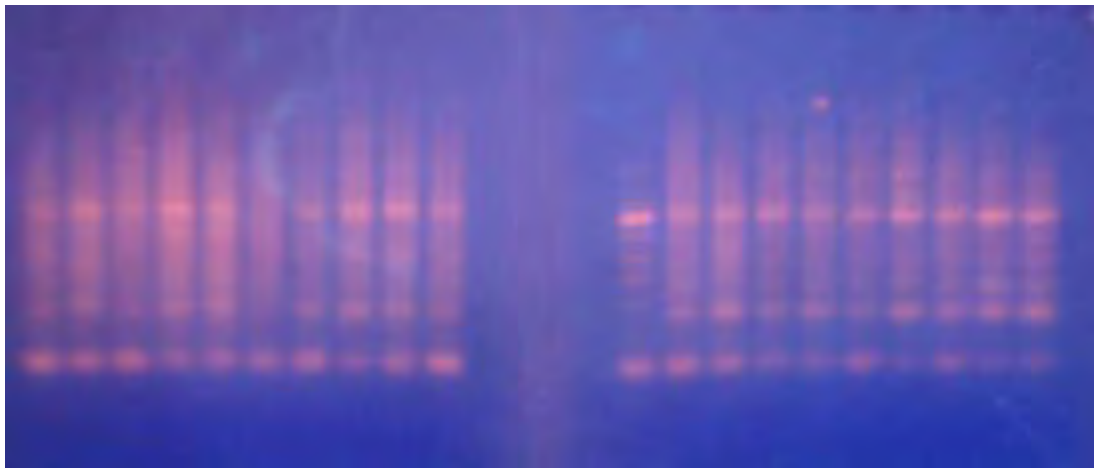
Στο τελευταίο 4<sup>ο</sup> σύνολο ομαδοποιούνται δυο γενότυποι υψηλής ρητίνης της Χαλκιδικής (P.h-R-X5 και P.h-R-X6) με δείκτη συγγένειας 0,65 ενώ με τον δείκτη NEIGHBORJOIN δεν ομαδοποιούνται οι δυο γενότυποι.

Το δένδρογράμμα έδειξε επίσης την ύπαρξη ενός γενότυπου υψηλής ρητίνης της Εύβοιας (P.h-R-E2), ο οποίος διαφέρει εντελώς από όλους τους άλλους γενότυπους, τόσο της Εύβοιας όσο και της Χαλκιδικής.

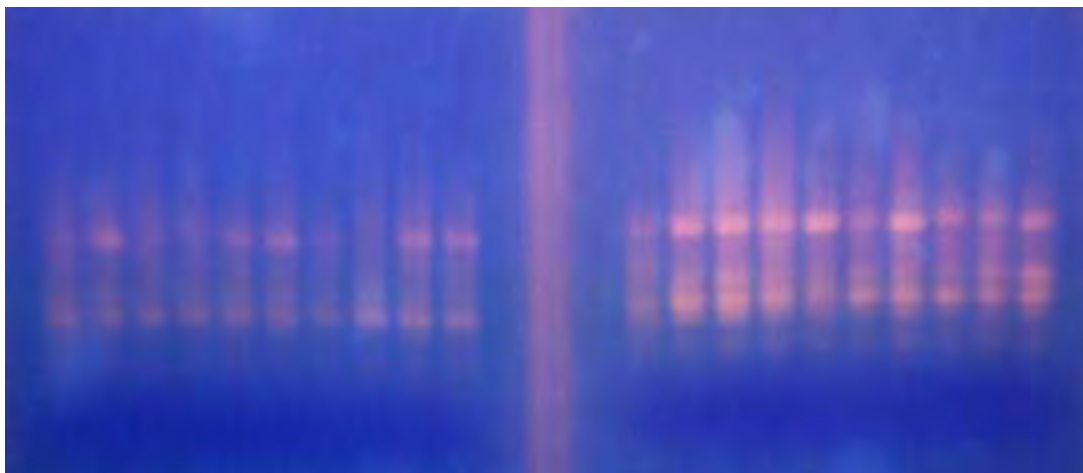
Παραδείγματα εικόνων των πολυμορφισμών των δεικτών τύπου RAPDs.



Εικόνα 5. Πολυμορφισμοί του εκκινητή OPG-16.

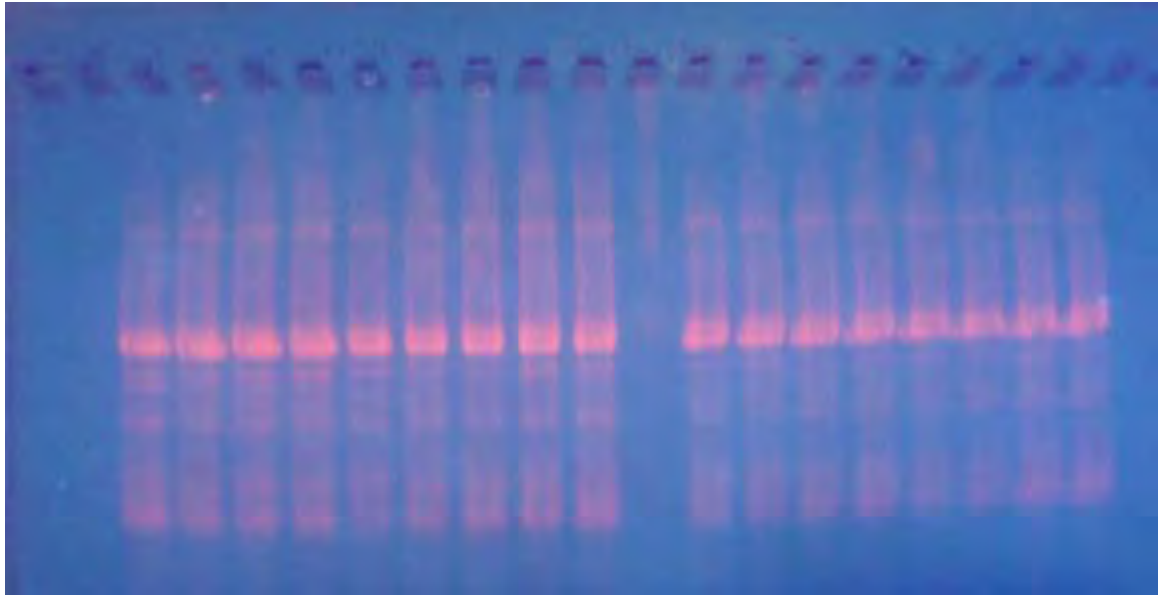


Εικόνα 6. Πολυμορφισμοί του εκκινητή OPG-17.

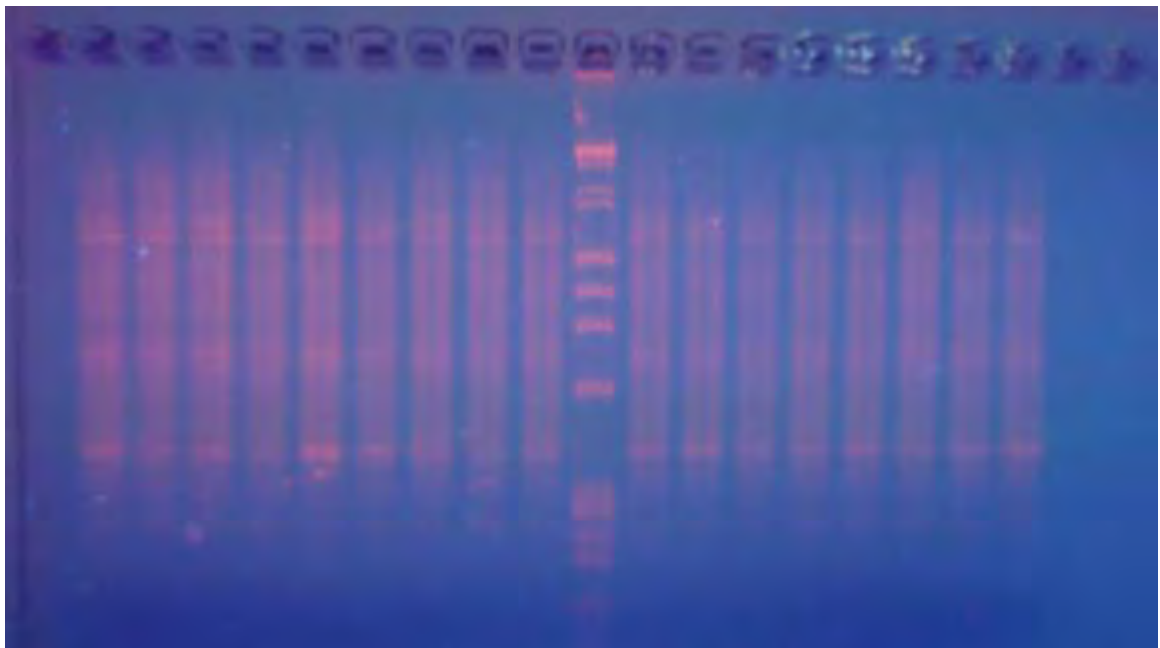


Εικόνα 7. Πολυμορφισμοί του εκκινητή OPD-5.

Στην αρχή του πειράματος και με την χρήση δυο εκκινητών, του εκκινητή OPG-5 (5'-CTGAGACGGA-3') και του εκκινητή OPG-14 (5'-GGATGAGAC-3'), οι οποίοι είναι παρόμοιοι στην ακολουθία τους, φάνηκε ο διαχωρισμός των γενοτύπων σε χαμηλής και υψηλής ρητίνης. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν επαναλήφθηκαν σε επόμενες αναλύσεις, όταν τα δείγματα ήταν παλαια. Οι γενότυποι ήταν οι εξής, από τα αριστερά προς τα δεξιά: E1, E3, E4, E5, E8, E11, X9, X11, X16, ΣΕ2, ΣΕ3, ΣΕ4, ΣΕ7, ΣΕ8, ΣΧ1, ΣΧ18, ΣΧ19 (Εικ. 8 και Εικ. 9).



Εικόνα 8. Εκκινητής OPG-5 με την χρήση δεικτών τύπου RAPDs.



Εικόνα 9. Εκκινητής OPG-14 με την χρήση δεικτών τύπου RAPDs.

Οι μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε αρκετά φυτικά γένη συμπεριλαμβανομένου και του γένους *Pinus* για την κατασκευή των φυλογενετικών σχέσεων (**Furman et al., 1997**).

Οι δείκτες RAPDs έχουν αποδεχθεί πολύ χρήσιμοι για την ανάλυση της γενετικής συγγένειας μεταξύ στενών συγγενικά ειδών πεύκου καθώς και μεταξύ διαφόρων υποκλάσεων του είδους (**Dvorak et al., 2000b**).

Οι γενετιστές που ασχολούνται με τους φυσικούς πόρους έχουν σκοπό τους να εκτιμήσουν το μέγεθος και το εύρος της γενετικής παραλλακτικότητας σε είδη τα οποία έχουν οικονομική σημασία καθώς και σε απειλούμενα είδη (**Fritsch & Rieseberg, 1996**).

Η ακριβής εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας είναι σημαντική για την βελτιστοποίηση των προγραμμάτων διατήρησης και του ελέγχου της διαθεσιμότητας των φυσικών πόρων των δέντρων (**Hamrick et al., 1991**).

Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών επάνω στο *Pinus halepensis* υποδεικνύουν ότι οι μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs είναι σημαντικοί για την εκτίμηση της γενετικής παρακτικότητας και για την μελέτη της διακύμανσης της μεταξύ των πληθυσμών, η οποία είναι δύσκολο να εκτιμηθεί στα δασικά είδη (**Mosseler et al., 1993**). Αυτό είναι σημαντικό ιδιαίτερα αν οι πληθυσμοί που εμπλέκονται είναι απομακρυσμένοι μεταξύ τους (**Petit et al., 1998**).

Οι μοριακοί δείκτες τύπου RAPDs που προέρχονται από μεγαγαμετοφυτικό DNA (Θηλυκό γαμετόφυτο από μεγασπόριο) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας στους πληθυσμούς του *Pinus halepensis* (**Gomez et al., 2001**).

Ο αριθμός των πολυμορφισμών ανά εκκινητή είναι συχνά μεγαλύτερος από τον αριθμό που βρέθηκε σε αυτήν την εργασία και συνήθως στα φυτά κυμαίνεται από 5-20. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά των **Catro-Felix et al., (2008)** οι οποίοι ανέφεραν 1,5 πολυμορφισμούς ανά εκκινητή σε Μεξικάνικα λευκά πεύκα (*Pinus lambertiana*, *Pinus ayacahuite*, *Pinus strobiformis*, *Pinus lambertiana* and *Pinus chiapensis*) και με αυτά των **Furman et al., (1997)**, οι οποίοι ανέφεραν 1,85 πολυμορφισμούς ανά εκκινητή.

Διάφορες έρευνες επάνω στην γενετική παραλλακτικότητα της χαλέπιου πεύκης (*Pinus halepensis*) αναφέρουν την χαμηλή γενετική παραλλακτικότητα ανεξαρτήτως, του χρησιμοποιούμενου δείκτη, είτε ήταν τερπένιο (**Baradat et al., 1995**), είτε ήταν αλλοένζυμο (**Teisseire et al., 1995**), είτε ήταν cpSSR (**Morgante et al., 1998**). Αυτή

η χαμηλή παραλλακτικότητα που ανιχνεύθηκε στο είδος *Pinus halepensis*, όπως και σε άλλα κωνοφόρα είδη σε όλο τον κόσμο, είναι το αποτέλεσμα μιας γενετικής καθυστέρησης (bottleneck effect). κατά την διάρκεια της εποχής των παγετώνων κατά την περίοδο του Ολόκενου.

Η γενετική παρακτικότητα της χαλέπιου πεύκης (*Pinus halepensis*) αναλύθηκε σε 9 πληθυσμούς οι οποίοι προέρχονται από την Ισπανία οι έξι, μια από Τυνησία, μια από Γαλλία και μια από την Ελλάδα (Gomez et al., 2001). Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 24 δείκτες τύπου RAPDs σε δείγμα DNA που προερχόταν από μητρικώς κληρονομούμενο υλικό από 60 μεγαγαμετόφυτα από κάθε πληθυσμό. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν υψηλή γενετική ποικιλομορφία εντός του πληθυσμού, υψηλότερη σε σχέση με άλλες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πληθυσμοί *Pinus halepensis* που προέρχονταν από την ανατολική λεκάνη της Μεσογείου ακολούθησαν διαφορετικό εξελικτικό δρόμο σε σχέση με τους πληθυσμούς στην δυτική Μεσόγειο (Gomez et al., 2001).

Η χρήση μοριακών δεικτών τύπου RAPD και ISSR στο *Pinus squamata* (Κίνα), ένα απειλούμενο είδος πεύκου, αποκάλυψε τα χαμηλά επίπεδα παραλλακτικότητας του πεύκου. Η γενετική παραλλακτικότητα του είναι η χαμηλότερη σε σχέση με κάθε άλλο είδος κωνοφόρου δέντρου ανεξαρτήτως του δείκτη που χρησιμοποιήθηκε (Wang et al., 1996).

Οκτώ χλωροπλαστικοί μικροδορυφόροι cpSSR πατρικώς κληρονομούμενοι χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας 10 πληθυσμών *Pinus halepensis*. Τα δείγματα προέρχονταν από τις περιοχές (Sabina και Aurunci) της Λάτσιο (Ιταλίας), από την περιοχή Valnevin της Umbria και την Abruzzo (Αδριατική ακτή) με σκοπό να ερευνηθούν τα εξής: Ο ποσοτικός γενετικός προσδιορισμός, ο καθορισμός της γενετικής δομής και ο διαχωρισμός μεταξύ φυσικών και εισαγόμενων υλικών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δεδομένων έδειξαν μια ισχυρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών (Armenise et al., 2008).

Χαμηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας αναφέρονται για το κόκκινο πεύκο (*Pinus resinosa*) μετά από εφαρμογή μοριακών δεικτών τύπου RAPDs (Mosseler et al., 1992).

Γίνεται επίσης αναφορά ότι το μεγαλύτερο από το πυρηνικό γένωμα του *Pinus sylvestris* δεν διαφοροποιείται μεταξύ των πληθυσμών από μια πληθώρα μοριακών



δεικτών DNA που χρησιμοποιήθηκαν (ισοένζυμα, RFLPs, μικροδορυφόροι, RAPDs, ριβοσωμικό DNA)(Karhu et al., 1996).

Χαμηλά επίπεδα παραλλακτικότητας βρέθηκαν νωρίτερα σε εργασίες με ισοένζυμα (Gullberg et al., 1985).

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο πληθυσμός της Εύβοιας είναι πιο ομοιογενής από τον πληθυσμό της Χαλκιδικής. Δεν υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των δυο πληθυσμών *Pinus halepensis* μεταξύ της Χαλκιδικής και της Εύβοιας.

Πιο καθαρός γενετικά εμφανίζεται ο πληθυσμός της Εύβοιας όπου φαίνεται ότι οι γενότυποι διαχωρίζονται σε υψηλής και χαμηλής ρητίνης.

Ο Panetsos, C. P. (1975) αναφέρει ότι υπάρχει φυσικός υβριδισμός μεταξύ *Pinus halepensis* και *Pinus brutia* μόνο σε περίπτωση που το *Pinus brutia* είναι ο θηλυκός γονέας σε αντίθετη περίπτωση το έμβρυο αποβάλλεται. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα αποτελέσματα μας στους γενότυπους της Χαλκιδικής δείχνουν ότι δεν είναι τόσο γενετικά καθαρός πληθυσμός για το λόγο ότι μπορεί να έχει υβριδιστεί και ότι δεν είναι τόσο απομονωμένος όσο ο πληθυσμός της Εύβοιας.

Ένα μειονέκτημα των RAPDs είναι και το ότι εμφανίζουν μερική επαναληψιμότητα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω α) διαφορετικής μεθοδολογίας για την απομόνωση του DNA, β) διαφορετικών πολυμερασών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR γ) διαφορετικές συσκευές που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR (Penner et al., 1993).

Εκεί να μπορούσαμε να πούμε ότι οφείλεται ότι δεν μπορέσαμε να επαναλάβουμε τα αποτελέσματα μας με τους εκκινητές OPG-5 και OPG-14.

Ακόμα το δένδrogramμα μας δείχνει ότι ο πληθυσμός της Χαλκιδικής είναι αρχέγονος σε σχέση με τον πληθυσμό της Εύβοιας. Από παλαιοληθικά στοιχεία βλέπουμε ότι οι πληθυσμοί των κωνοφόρων έχουν υποστεί μια γενετική παρέκκλιση (bottleneck effect) κατά την προηγούμενη περίοδο των παγετώνων. Ακόμα αναγκάστηκαν να μεταναστεύσουν από βορειότερα γεωγραφικά πλάτη σε χαμηλότερα. Οι αλλαγή του κλίματος και τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά των περιοχών μετανάστευσης οδήγησαν στην γενετική διαφοροποίηση του πληθυσμού.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

Δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός των δυο πληθυσμών πεύκου *Pinus halepensis* Χαλκιδικής και Εύβοιας. Πιο καθαρός γενετικά εμφανίζεται ο πληθυσμός της Εύβοιας όπου οι γενότυποι υψηλής & χαμηλής ρητίνης διαχωρίζονται με σαφή τρόπο. Ο πληθυσμός της Εύβοιας είναι περισσότερο ομοιογενής σε σχέση με τον πληθυσμό της Χαλκιδικής.

Από τα δένδρογράμματα βλέπουμε ότι ο πληθυσμός της Χαλκιδικής είναι πιο αρχέγονος. Επίσης οι γενότυποι με χαμηλή ρητίνη είναι πιο παλαιοί σε σχέση με αυτούς με υψηλή ρητίνη.

Τέλος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μια ομάδα από 15 εκκινητές για να διαχωριστούν οι δυο πληθυσμοί πεύκου Χαλκιδικής και Εύβοιας.

Αυτοί είναι:

OPD2, OPD4, OPD5, OPD6

OPF5, OPF10, OPF13

OPG4, OPG5, OPG8, OPG9, OPG12, OPG13, OPG14, OPG16

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Achenar M.** (1981). La colonisation des friches par le pin d' Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans les basses garrigues du Montpellierais. Theses Doct. 3eme cycle, Ecologie, Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, pp.210.

**Alma R. Villalobos-Ara mbula** (2008). Genetic relationships among Mexican white pines (*Pinus*, Pinaceae) based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 523–530

**Arnold M.L., Buckner C.M., Robinson J.J.** (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1398-1402. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 237-250.

**Baradat P., Michelozzi M., Tognetti R., Khouja M.L.** (1995). Geographical variation in the terpene composition of *Pinus halepensis* Mill., in: Baradat Ph., Adams W.T., Müller-Starck G.(Eds.), *Populations genetics and genetic conservation of forest*

**Barden L.S.** (1979). Serotiny and seed viability of *Pinus pungens* in the Southern Appalachians. *Castaneae*, 44: 44-47.

**Borchert M.** (1985). Serotiny and cone-habit variation in populations of *Pinus coulteri* (Pinaceae) in the Southern coast ranges of Callifornia. *Madrono*, 32: 29-48.

**Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R., Cavalli-Sforza L.L.** (1994). High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature(London)* 368: 455-457.

**Brown N.A.C., Jamieson H., Botha P.A.** (1994). Stimulation of seed germination in Souht African species of Restionaceae by plant derived smoke. *Plant growth regulation*, 15: 93-100.

**Cai Q., Guy C. Moore G.A.** (1994). Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive.

**Carlson J.E., Tulsieram L.K., Glaubitz J.C., Luk V., Kauffeldt C., Rutledge R.** (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F<sub>1</sub> progeny of conifers. *Theor. Applied Genet.* 83:194-200.

Castro-Félix P., Pérez de la Rosa J.A., Amado G.V., Magaña S.V., Santerre A., López-Dellamary Toral F., Villalobos-Arámbula A.R. (2008). Genetic relationships among Mexican white pines (*Pinus*, Pinaceae) based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology.* 36 (7), pp. 523-530.

Choumane W., Van Breugel P., Bazuin T.O.M., Baum M., Ayad G.W., Amaral W. (2004). Genetic diversity of *Pinus brutia* in Syria as revealed by DNA markers. *Forest Genetics* 11 (2), pp. 87-101.

**Daskalakou E.N. and Thanos C.A.** (1996). Aleppo pine (*Pinus halepensis*) postfire regeneration: the role of canopy and soil seed banks. *Int. J. Wildland Fire*, 6: 59-66.

**Dayanandan D., Rajora O.P. Bawa K.S.** (1998). Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theor. Appl. Genet.* 96:950-956.

**Dirik H.** (2000). Analysis of pressure volume (P-V) curves within dry season of Calabrian pine (*Pinus brutia* Ten.) provenances from different bioclimatic zones. *I.C. Orman Fakultesi Dergisi*, A: 50: 100-103.

**Dvorak W.S., Jordon A.P., Hodge G.R., Romero J.L.** (2000b). Assessing evolutionary relationships of pines in the Oocarpae and Australes subsections using *Ecological Monographs*, 43: 125-143.

**Eron Z. and Sarigul M.** (1992). Natural regeneration of *Pinus brutia* achieved at laying out cone bearing branches in fire burned sites in the Aegean region, *Turkish Forest Research Institute, Technical Report*, 48: 7-37.

**Eshel A., Henig-Sever N., Ne'eman G.** (2000). Spatial variation of seedling distribution in an East Mediterranean woodland at the beginning of post fire succession. *Plant Ecology*.

**Ferrandis P., Herranz J.M., Martinez-Sanchez J.J.** (1996). The role of soil seed Forest Fire Research, Vol. II, Coimbra, Portugal, pp. 887-897.

Fournier N., Rigling A., Dobbertin M., Gugerli F. (2006). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns show weak genetic differentiation between low- and high-elevation types of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in dry continental valleys in the Alps. *Annals of Forest Science* 63 (4), pp. 431-439.

**Frankis M.P.** (1991). Fire-climax pines: There's more to it than you thought! *Newsletters Conifer Society of Australia*, 9: 8-9.

**Fraver S.** (1992). The insulating value of serotinous cones in protecting pitch pine (*Pinus rigida*) seeds from high temperatures. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*, 65: 112-116.

**Furman B.J., Grattapaglia D., Dvorak W.S., O'Malley D.M.** (1997). Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican Pines using RAPD markers that distinguish species. *Mol. Ecol.* 6: 321-331.

**Gaussen H.**, (1993). Heywood V.H. and Chater A.O.. *Pinus* L. Tutin *et al.* (eds), *Flora Europaea*, Second Edition, Cambridge University Press, 1: 40-44.

**Glick B.R. and Pasternak J.J.** (1998). Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA.

**Hedrick P.** (1992). Shooting the RAPDs. *Nature*(London) 355: 679-680.

**Henig-Sever N.** (1997). Regulation of germination by Ash and its ecological significance in post fire germination of Mediterranean vegetation. Ph.D. Dissertation, Tel Aviv University, Tel Aviv (in Hebrew with an English abstract).

**Hernandez P., Laurie D.A., Martin A., Snape J.W.** (2002). Utility of wheat simple sequence repeat (SSR) markers for genetic analysis of *Hordeum chilense* and tritordeum. *Theor. Appl. Genet.* 104: 735-739.

**Izhaki I.** (2000). Passerine bird communities in mediterranean pine forests. In: *Ecology, Biogeography and Management of Pinus halepensis and P. brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin*, G. Ne'eman and L. Trabaud (eds.), Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 237-250.

**Izhaki I., Henig-Sever N., Ne'eman G.** (2000). The effect of heat exposure, ash cover and microhabitat type on the germinable seed bank in Mediterranean Aleppo pine forests. *Journal of Ecology*, 13: 134-141.

**Jondle R.J.** (1992). Legal aspects of varietal protection using molecular markers. Applications of RAPD technology to plant breeding . Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992, Minneapolis, Minnesota.

Kant A., Pattanayak D., Chakrabarti S.K., Sharma R., Thakur M., Sharma D.R. (2006). RAPD analysis of genetic variability in *Pinus gerardiana* Wall. in Kinnaur (Himachal Pradesh). *Indian Journal of Biotechnology* 5 (1), pp. 62-67.

**Karhu A., Hurme P., Karjalainen M., Karvonen P., Kiirkkaiinen K., Neale D., Savolainen O.** (1996). Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor Appl Genet.* 93:215-221

**Kim M. S., Brunsfeld S. J., McDonald G. I., Klopfenstein E.** (2003). Effect of white pine blister rust (*Cronartium ribicola*) and rust-resistance breeding on genetic variation in western white pine (*Pinus monticola*). *Theor. Appl. Genet.* 106: 1004–1010.

Kim Z.S., Hwang J.W., Lee S.W., Yang C., Gorovoy P.G. (2005). Genetic variation of Korean pine (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) at allozyme and RAPD markers in Korea, China and Russia. *Silvae Genetica* 54 (4-5), pp. 235-246.

**Klaus W.** (1989). Mediterranean pines and there history. *Plant Systematics and Evolution*, 162: 133-163.

**Lamont B.B.** (1991). Canopy seed storage and release-whats a name? *Oikos*, 60: 266-268.

**Lamont B.B., Le Maitre D.C., Cowling R.M., Enright N.J.** (1991). Canopy seed storage in woody plants. *The Botanical Review*, 57: 277-317.

**Lev-Yadum S.** (1992). Aggregated cones in *Pinus halepensis*. *Aliso*. 13: 475-485.

**Lev-Yadum S.** (1995). Living serotinous cones in *Cupressus sempervirens*. *International Journal of Plant Science*, 156: 50-54.

Li C., Chai B., Wang M. (2008). Population genetic structure of *Pinus tabulaeformis* in Shanxi Plateau, China. *Russian Journal of Ecology* 39 (1), pp. 34-40.

Lise Y., Kaya Z., Isik F., Sabuncu R., Kandemir I., Onde S. (2007). The impact of over-exploitation on the genetic structure of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) populations determined by RAPD markers. *Silva Fennica* 41 (2), pp. 211-220

Mehes M.S., Nkongolo K.K., Michael P. (2007). Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: Development of genome-specific SCAR markers. *Plant Systematics and Evolution* 267 (1-4), pp. 47-63.

**Mirov N.T.** (1967). The Genus *Pinus*. Ronald Press Co., N.Y., pp. 602.

Monteleone I., Ferrazzini D., Belletti P. (2006). Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra. *Silva Fennica* 40 (3), pp. 391-406.

**Morgante M. and Olivieri A.M.** (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182.

**Morgante M., Felice N., Vendramin G.G.** (1998). Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck, in: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (Eds.), *Molecular tools for screening biodiversity*, Chapman and Hall, London. pp. 407–412.

**Mosseler A., Egger K.N., Innes D.J.** (1993). RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) confirm low levels of molecular genetic diversity in red pine (*Pinus resinosa* Ait.), in: Pardos J.A., Ahuja M.R., Elena Roselló R. (Eds.), *Biotechnology of trees. Proceedings of the IUUFRO Working Party S2.0407, Somatic Cell Genetics*, 18–23 October 1993, Valsain, Spain, p. 167.

**Musil C.F. and de Witt D.M.** (1991). Heat stimulated germination in two Restionaceae species. *S.Afr. J. Bot.*, 57: 175-176.

**Nahal I.** (1983). Le pin brutia (*Pinus brutia* Ten. Subsp. *brutia*), Premeiere partie. *Foret Mediterraneeenne*, 5 : 165-172.

**Nathan R. and Ne'eman G.** (2000). Serotiny, seed dispersal and seed predation in *Pinus halepensis*. *Ecology, Biogeography and Management of Pinus halepensis and P. brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin*, G. Ne'eman and L. Trabaud (eds.), Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 105-118.

**Nathan R., Safriel U.N., Noy-Meir I., Schiller G.** (1999). Seed release without fire in *Pinus halepensis*, a Mediterranean serotinous wind-dispersed tree. *Journal of Ecology*, 87: 659-669.



**Ne'eman G.** (1997). Regeneration of natural pine forest- a review of work done after 1989 fire in Mount Carmel, Israel. *International Journal of Wildland*, 7: 295-306.

**Nkongolo K. K., Michael P., Gratton W. S.** (2002). Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among Pine species. *Genome* 45: 51–58.

**Panetsos, C. P.** (1975) Natural hybridization between *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Greece. *Silvae Genet.* 24, 163-168.

**Panetsos C.P.** (1981). Monograph of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus brutia* Ten., *Annales Forestales* (Zagreb), 9: 39-77.

**Panetsos C.P.** (1986). Genetics and breeding in the group *halepensis*. Options Mediterraneennes. Seminaire: Le pin D; Alep Et le pin brutia dans la sylviculture Meditrraneennes (15-19 April 1985, Tunisia): 81-88.

**Patricia Castro-Felix, Jorge A. Pe rez de la Rosa, Georgina Vargas Amado, Petit R.J., El Mousadik A., Pons O.** (1998)Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers, *Conserv. Biol.* 4: 844– 855.

Peng S.L., Li Q.F., Li D., Wang Z.F., Wang D.P. (2003). Genetic diversity of *Pinus massoniana* revealed by RAPD markers. *Silvae Genetica* 52 (2), pp. 60-63.

Penner G.A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S.J., Fedak G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Res.* 2: 341-345.

**Quezel P. and Barbero M.** (1992). Le pin d' Alep et les especes voisines: repartition et caracteres ecologiques generaux, sa dynamique recent en France mediterraneenne. RAPD markers. *New Forest* 20, 163–192.

**Reiter R.S., Williams J., Feldmann K.A., Rafalski J.A., Tingey S.V., Scolnik P.A.** (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using

recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477-1481.

**Robertson R. and Treuven T.** (2000). RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

**Salvador Vela'squez Magana, Anne Santerre, F. Lo pez-Dellamary Toral, Sanchez de la Hoz M. P. S., Davila J. A., Loarce Y., Ferrer E.** (1996). Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39: 112–117.

**Saracino A. and Leone V.** (1993). The ecological role of fire in aleppo pine forests: overview of recent research. *Proceedings of the 2nd International Conference on Forest Fire Research, Vol. II, Coimbra, Portugal*, pp. 887-897.

**Scierwater B. and Ender A.** (1993). Different thermostable DNA polymerases may apply to different RAPD products. *Nucleic Acids Research* 21: 4647-4648.

**Scordilis A. and Thanos C.A.** (1995). Seed stratifactor and germination strategy in the Mediterranean pines *Pinus brutia* and *P. halepensis*. *Seed Science Research*, 5: 151-160.

**Sefik Y.** (1965). Studies on the cone and the seed of *Pinus brutia* (*Pinus brutia* Ten. ) (in Turkish), *Orman Genel Mudurlugu Yayinlaridan*, 420: 1-93.

**Spanos I.A.** (1994). Natural regeneration of *Pinus brutia* in north-west areas of Thasos Island, burned in 1989 (in greek). *Geotechnika Epistimonika Themata* (Greece), 4: 33-39.

**Spooner D., Treuren R. Van, De Vicente M.C.** (2005). Molecular markers for genebank management. In: *IPGRI Technical Bulletin No. 10*, 2005.

**Stone E.C. and Juhren G.** (1951). The effect of fire on the germination of the seed of *Rhus ovata* Wats. *Amer. J. Bot.*, 38: 386-372.

- Stone E.L. and Stone M.H.** (1954). Root collar sprouts in pine. *Journal of Forestry*, 52: 487-491.
- Teisseire H., Fady B., Pichot Ch.** (1995). Allozyme variation in five French populations of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller). *For. Genet.* 2: 225–236.
- Thanos C.A., Daskalakou E.N., Nikolaidou S.** (1996). Early postfire regeneration of *Pinus halepensis* forest at Mount Parnes Attica, Greece, *Journal of Vegetation Science* 7: 273-280.
- Trabaud L., Martinez-Sanchez J.J., Ferrandis P., Gonzalez-Ochoa A.I., Herranz J.M.** (1997). Above-ground vegetation and soil seed bank-The contribution to the cyclical stability of a mixed pine forest of *Pinus halepensis* and *P. pinaster*. *Canadian Journal of Botany*, 75: 1012-1021.
- Traubaud L.,** (1988). Survie de jeunes plantule de pin d' Alep apparues apres incendie. *Studia oecologica*, 5: 161-170.
- Traubaud L., Grosman J., Walter T.** (1985a). Recovery of burnt *Pinus halepensis* Mill. Forests. I. Understorey and litter phytomass development after wildfire. *Forest Ecology and Management*, 12: 269-277.
- Virk P.S., Ford-Lloyd B.V., Jackson T.M., Newbury H.J.** (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* 74: 170-179.
- Vogl R.J.** (1973). Ecology of knobcone pine in the Santa Ana mountains, California. *Ecological Monographs*, 43: 125-143.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee Van de T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.** (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

**Wang M.B and Gao F.Q.** (2009). Genetic variation in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*), a woody species endemic to China. *Biochemical Genetics*. 47: 154-164.

**Wilde J., Waugh R., Powell W.** (1992). Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Applied Genet.* 83: 871-877.

**Williams J.G. and Kubelik K.J.** (1990). Characteristics of genetic markers.

**Young J.A. and Young C.G.** (1992). Seeds of woody plants in North America. Dioscorides Press, Portland, Oregon, pp. 407.

#### ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Βακαλουνάκης Δ.Ι. και Φραγκιαδάκης Γ.Α.** (2003). Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στη τομάτα και τα κολοκυνθοειδή. Βακαλουνάκης, Ηράκλειο. Σελ: 163-227. διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σ. 144.

**Μαυρομάτης Α.**(2005). Προχωρημένη Γενετική. Μοριακοί, βιοχημικοί και μορφολογικοί δείκτες. Μια συνδυασμένη πορεία στη γενετική φυτών. Σημειώσεις στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών.

**Ντάφης Σ.** (1986). Δασική οικολογία. Δάσος και φωτιά, 214-218. Θεσσαλονίκη, σ. 443.

**Ντάφης Σ.** (1987). Οικολογία των δασών χαλεπίου και τραχείας πεύκης. Πρακτικά Ελληνικής δασολογικής Εταιρείας. Δάση χαλεπίου και Τραχείας πεύκης (Οικολογία – Διαχείριση – Αξιοποίηση), 30/9 – 2/10/87, Χαλκίδα, 17-25.

**Ντάφης Σ.** (2007). Η ζωή επιστρέφει στα καμένα της Πάρνηθας. Πλατύφυλλα δέντρα και πεύκα αναγεννώνται χωρίς παρέμβαση – Αναδάσωση για την ελάτη. Πρακτικά επιτροπής ΓΕΩΤ.Ε.Ε. για την αποκατάσταση της Πάρνηθας. πυρκαγιά στα δάση χαλεπίου πεύκης της Κασσάνδρας Χαλκιδικής. Διδακτορική

**Σαργλής Π.Γ.(1999).** Συστηματική βοτανική. Εφαρμογές Κορμοφύτων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης. ISBN: 960-351-270-2.

**Σκαράκης Γ.Ν.(2005).** Κλασική και μοριακή βελτίωση φυτών. Σημειώσεις στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών.

**Σκορδύλης Α.Ι. (1992).** Εργαστηριακή και Οικοφυσιολογική μελέτη της φύτευσης των σπερμάτων και της ανάπτυξης των αρτίβλαστων στα είδη *Pinus brutia* και *P. halepensis*. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα, σ. 199.

**Τσιτώνη Θ. (1991).** Ανάλυση δομής και συνθήκες φυσικής αναγέννησης μετά από

**Υπουργείο Ανάπτυξης και Τροφίμων, ΓΓ.ΦΠ. (1992).** Αποτελέσματα πρώτης Εθνικής Απογραφής δασών, Αθήνα, σ.134.

**Φανουράκης Ν. (2002).** Γενετική βελτίωση φυτών. Βασικές αρχές.

**Χατζόπουλος Π. (2001).** Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδόσεις “ΕΜΒΡΥΟ”, Αθήνα. Σελ: 33-90, 325-354.

#### ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ – INTERNET

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PIHA7>

<http://www.euforgen.org>

[http://www.flowersinisrael.com/Pinushalepensis\\_page.htm](http://www.flowersinisrael.com/Pinushalepensis_page.htm)

<http://www.fao.org/forestry/foris/data/silvamed/arezzo/alizoti.pdf>